

Über einen photometrischen Schwangerschafts-  
nachweis aus hämolysefreiem und hämolytischem  
Serum sowie aus getrockneten Blutflecken mit Hilfe  
der hitzestabilen alkalischen Phosphatase  
(EC 3.1.3.1)

INAUGURAL-DISSERTATION  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Zahnheilkunde  
dem Fachbereich Humanmedizin  
der Philipps-Universität zu Marburg

vorgelegt von  
Wolfgang Köhler  
aus Kassel

Marburg 1976







Über einen photometrischen Schwangerschafts-  
nachweis aus hämolysefreiem und hämolytischem  
Serum sowie aus getrockneten Blutflecken mit Hilfe  
der hitzestabilen alkalischen Phosphatase  
(EC 3.1.3.1)



INAUGURAL-DISSERTATION  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Zahnheilkunde  
dem Fachbereich Humanmedizin  
der Philipps-Universität zu Marburg

vorgelegt von  
Wolfgang Köhler  
aus Kassel

Marburg 1976



Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin  
der Universität Marburg am 20. 2. 1976

gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Prof. Dr.med. H. Oepen

Referent: Prof. Dr.med. I. Oepen

Correferent: Prof. Dr.med. W. Wesemann

Prof. Dr.med., Dr.med.dent. H.J. Hering

## Inhalt

Seite

|   |                                                                                                                                                  |    |
|---|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| A | Einleitung                                                                                                                                       |    |
|   | 1. Einführung in die Thematik                                                                                                                    | 5  |
|   | 2. Die Methode von OYA, ASANO und FUWA                                                                                                           | 12 |
| B | Versuche mit hämolysefreiem Serum                                                                                                                |    |
|   | Modifikation der Methode von OYA, ASANO und FUWA                                                                                                 |    |
|   | 1. Grundsätzliche Vorbemerkungen                                                                                                                 | 14 |
|   | 2. Die Substratkonzentration                                                                                                                     | 15 |
|   | 3. Der Leerwert                                                                                                                                  | 15 |
|   | 4. Die Wellenlänge bei der Extinktionsmessung                                                                                                    | 20 |
|   | 5. Der Puffer und sein pH-Wert                                                                                                                   | 20 |
|   | 6. Eliminierung der hitzelabilen Phosphatase                                                                                                     | 23 |
| C | Versuch mit hämolytischem Serum                                                                                                                  |    |
|   | Einfluß von gelösten Serumproteinen und der Hämolysen                                                                                            | 27 |
| D | Versuche mit getrockneten Blutflecken                                                                                                            |    |
|   | 1. Allgemeine Betrachtungen                                                                                                                      | 37 |
|   | 2. Ein Vorversuch                                                                                                                                | 38 |
|   | 3. Versuch einer methodischen Verbesserung                                                                                                       | 42 |
| E | Versuch mit Hilfe der bisher erarbeiteten Methode, Leistungen der Methode, Aussagemöglichkeiten der Ergebnisse und Feststellung der Fehlerbreite | 52 |
| F | Optimale Technik mit zusätzlicher Bestimmung der hitzestabilen alkalischen Phosphatase nach Verlängerung der Enzymreaktion auf 24 Stunden        |    |
|   | 1. Ergebnisvergleich zwischen 1stündiger und 24stündiger Inkubation bei Untersuchung von Seren und Blutflecken mit und ohne Schimmelbildung      | 63 |
|   | 2. Untersuchung von bis zu 3 Monate alten Blutflecken bei 24stündiger Inkubation                                                                 | 70 |

3. Untersuchung von bis zu 19 Monate alten  
Blutflecken bei 24stündiger Inkubation 78
4. Kurze Beschreibung der optimalen Technik 82

G Zusammenfassung 84

H Anhang: Tabellarische Darstellung der verwen-  
deten Blutflecken und ihr Herstellungsdatum 86

K Literatur 87

## A Einleitung

### 1. Einführung in die Thematik

Bei der Aufklärung von Gewaltdelikten leistet die Blutspurenuntersuchung einen wichtigen Beitrag. In einigen Fällen ist die Frage zu beantworten, ob eine Blutspur von einer Schwangeren verursacht wurde: z.B. wenn es sich um Verletzung oder Ermordung einer schwangeren Frau handelt und ein Tatverdächtiger Blutspuren aufweist. Ferner ist die Frage von Bedeutung, wenn eine Abtreibung oder Kindestötung kurz nach der Geburt vermutet wird, wobei der Nachweis einer geleugneten Schwangerschaft ein wesentlicher Bestandteil der Beweisführung sein kann.

Während der Schwangerschaftsnachweis aus Blutspuren, die aus Abort- oder Geburtsblut herrühren und somit zuvor die Geburtswege passiert haben, u.a. durch den Nachweis von Beimengungen aus Fruchtwasser oder zelligen Bestandteilen der Geburtswege geführt werden kann (SCHLEYER), ist es darüber hinaus von forensischem und wissenschaftlichem Interesse, eine Schwangerschaft auch an solchem Blut bzw. entsprechenden Blutflecken festzustellen, welches nicht zuvor die Geburtswege passiert hat, sondern aus anderen Wunden stammt. Das ist mit Hilfe der Gonadotropin-Bestimmung an Venen- und Abortblut während der ersten Hälfte der Schwangerschaft gut möglich. Dagegen gestattet der niedrige Spiegel des Hormons am Ende der Schwangerschaft den Nachweis aus Geburtsblut mit dieser Methode nur bis zu einem Blutfleckenalter von etwa 33 Tagen, wobei erschwerend hinzukommt, daß große Blutflecken ( $50 \text{ cm}^2$ ) benötigt werden (HAAG).

Ein neuer Schwangerschaftsnachweis wurde 1973 von OYA, ASANO und FUWA beschrieben, der auf der Bestimmung der hitze-stabilen alkalischen Phosphatase beruht.

Im Gegensatz zur sauren Phosphatase, die im Laufe der Gravidität abnimmt (JEACOCK et al.), steigt die alkalische Phosphatase während der Schwangerschaft im Blut an, und zwar

besonders deutlich in der zweiten Hälfte der Schwangerschaft. Sie erreicht ihr Maximum etwa zum Zeitpunkt der Geburt und fällt dann innerhalb von etwa einem Monat post partum steil auf nahezu normale Werte wieder ab (CAYLA und FABRE, VERMEHREN, BECK und CLARK).

Die hitzestabile alkalische Phosphatase wird nach empirischen Gesichtspunkten als der Anteil der alkalischen Phosphatase definiert, der nach einer Erhitzung im Wasserbad auf 56°C über eine Zeit von 30 min erhalten bleibt (McMASTER et al., AOBA et al., YOUNG).

Es hat sich erwiesen, daß diese hitzestabile Fraktion, die placentaren Ursprungs ist, an der Erhöhung des Enzyms während der Schwangerschaft ausschließlich beteiligt ist (AOBA et al.).

Eine im Rahmen dieser Arbeit versuchte Kontrolle bezüglich des Anstiegs der Gesamtposphatase und der hitzestabilen alkalischen Phosphatase während der einzelnen Schwangerschaftswochen ergab wegen der geringen Anzahl der Werte pro Schwangerschaftswoche einen zackenreichen Kurvenverlauf, bestätigt aber insgesamt die Angaben in der Literatur (YOUNG).

Die Ergebnisse dieser Kontrolluntersuchung sind in Tab.1 und Fig.1 dargestellt. In diesem Vorversuch wurde eine Technik für den Nachweis der hitzestabilen alkalischen Phosphatase verwendet, die an hämolysefreiem Serum zuverlässige Befunde liefert. Für hämolytische Seren und Blutflecken mußte die Methode aber modifiziert werden, was in den Kapiteln B bis F beschrieben wird.

Tabelle 1:

Orientierende Untersuchung über den Anstieg der Gesamtphosphatase und der hitzestabilen alkalischen Phosphatase in den einzelnen Schwangerschaftswochen

Technische Daten:

Serummenge: 0,1 ml hämolysefreies Serum  
 Puffer: 0,5 ml Carbonat-Puffer pH 10,05  
 Eliminierung der hitzelabilen Phosphatase: 40 min bei 60°C im Warmluftschrank  
 Substratkonzentration: 0,5 ml Dinatrium-p-Nitrophenylphosphat (0,0928 g/ 50 ml)  
 Enzymreaktion: 45 min bei 37°C im Warmluftschrank  
 Unterbrechung der Enzymreaktion mit 1 ml 10%iger Trichlor-essigsäure  
 Alkalisieren: Gesamter Probenansatz + 4 ml 0,2 N NaOH (vgl. Kap. C)  
 Leerwert: Chemikalienblindwert  
 Extinktionsmessung: bei 405 nm im Eppendorf-Photometer

Tab. 1      A) Gesamtphosphatase  
             B) hitzestabile alkalische Phosphase

| Schwangerschaftswoche | 8     | 10    | 11    | 12    | 13     | 14    |
|-----------------------|-------|-------|-------|-------|--------|-------|
| A                     | 0,175 | 0,160 | 0,112 | 0,155 | 0,222  | 0,117 |
| B                     | 0,002 | 0,016 | 0,016 | 0,016 | 0,017  | 0,023 |
| A                     |       |       |       | 0,178 | 0,185  | 0,145 |
| B                     |       |       |       | 0,002 | 0,009  | 0,012 |
| A                     |       |       |       |       | 0,097  |       |
| B                     |       |       |       |       | -0,004 |       |
| A                     |       |       |       |       | 0,163  |       |
| B                     |       |       |       |       | -0,010 |       |
| Mittelwert A          | 0,175 | 0,160 | 0,112 | 0,167 | 0,167  | 0,131 |
| Mittelwert B          | 0,002 | 0,016 | 0,016 | 0,009 | 0,003  | 0,018 |

Tab. 1 (Fortsetzung)

| Schwanger-<br>schaftswoche | 15    | 16    | 17    | 18    | 19    | 20    |
|----------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| A                          | 0,129 | 0,188 | 0,184 | 0,236 | 0,174 | 0,216 |
| B                          | 0,025 | 0,018 | 0,013 | 0,020 | 0,029 | 0,035 |
| A                          | 0,183 | 0,208 |       | 0,184 | 0,236 | 0,202 |
| B                          | 0,016 | 0,002 |       | 0,025 | 0,013 | 0,025 |
| A                          | 0,165 |       |       |       |       | 0,160 |
| B                          | 0,006 |       |       |       |       | 0,039 |
| A                          | 0,150 |       |       |       |       |       |
| B                          | 0,023 |       |       |       |       |       |
| Mittelwert A               | 0,157 | 0,198 | 0,184 | 0,210 | 0,205 | 0,193 |
| Mittelwert B               | 0,018 | 0,010 | 0,013 | 0,023 | 0,021 | 0,033 |

| Schwanger-<br>schaftswoche | 22    | 23    | 24    | 25    | 26    | 27    |
|----------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| A                          | 0,186 | 0,203 | 0,330 | 0,360 | 0,200 | 0,209 |
| B                          | 0,048 | 0,048 | 0,047 | 0,062 | 0,047 | 0,033 |
| A                          | 0,225 | 0,289 | 0,132 |       |       |       |
| B                          | 0,037 | 0,012 | 0,018 |       |       |       |
| A                          |       |       |       |       |       |       |
| B                          |       |       |       |       |       |       |
| A                          |       |       |       |       |       |       |
| B                          |       |       |       |       |       |       |
| Mittelwert A               | 0,206 | 0,246 | 0,231 | 0,360 | 0,200 | 0,209 |
| Mittelwert B               | 0,043 | 0,030 | 0,033 | 0,062 | 0,047 | 0,033 |

| Schwanger-<br>schaftswoche | 28    | 29    | 30    | 31    | 32    | 33    |
|----------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| A                          | 0,240 | 0,310 | 0,250 | 0,157 | 0,208 | 0,464 |
| B                          | 0,037 | 0,127 | 0,095 | 0,076 | 0,095 | 0,259 |
| A                          | 0,135 | 0,435 |       | 0,152 | 0,203 | 0,373 |
| B                          | 0,031 | 0,092 |       | 0,077 | 0,083 | 0,174 |
| A                          |       | 0,268 |       |       |       | 0,235 |
| B                          |       | 0,082 |       |       |       | 0,130 |
| A                          |       |       |       |       |       | 0,266 |
| B                          |       |       |       |       |       | 0,099 |
| Mittelwert A               | 0,188 | 0,338 | 0,250 | 0,155 | 0,206 | 0,335 |
| Mittelwert B               | 0,034 | 0,100 | 0,095 | 0,077 | 0,089 | 0,166 |

Tab. 1 (Fortsetzung)

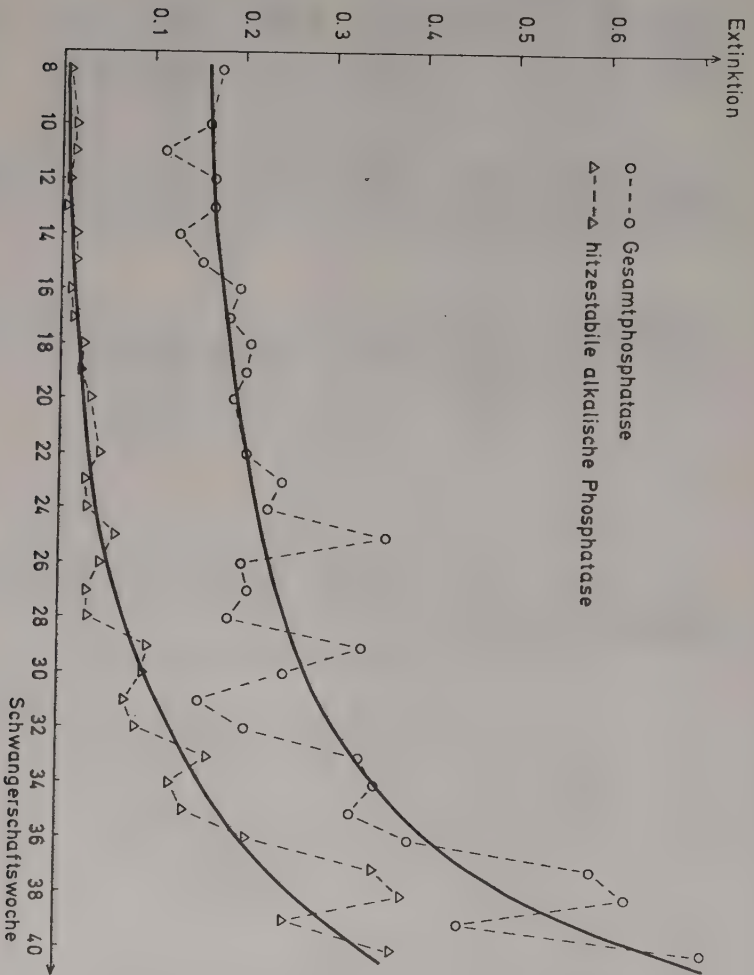
| Schwanger-<br>schaftswoche | 34    | 35    | 36    | 37    | 38    | 39    |
|----------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| A                          | 0,350 | 0,480 | 0,500 | 0,680 | 0,708 | 0,453 |
| B                          | 0,125 | 0,197 | 0,245 | 0,462 | 0,360 | 0,280 |
| A                          |       | 0,204 | 0,285 | 0,548 | 1,020 | 0,465 |
| B                          |       | 0,078 | 0,139 | 0,295 | 0,671 | 0,300 |
| A                          |       | 0,356 | 0,435 | 0,542 | 0,442 | 0,418 |
| B                          |       | 0,195 | 0,319 | 0,300 | 0,286 | 0,188 |
| A                          |       | 0,252 | 0,345 |       | 0,330 |       |
| B                          |       | 0,089 | 0,142 |       | 0,203 |       |
| Mittelwert A               | 0,350 | 0,323 | 0,391 | 0,593 | 0,625 | 0,445 |
| Mittelwert B               | 0,125 | 0,140 | 0,211 | 0,352 | 0,380 | 0,256 |

|                            |    |
|----------------------------|----|
| Schwanger-<br>schaftswoche | 40 |
|----------------------------|----|

|   |       |
|---|-------|
| A | 0,710 |
| B | 0,370 |

|              |       |
|--------------|-------|
| Mittelwert A | 0,710 |
| Mittelwert B | 0,370 |

Fig. 1: Orientierende Untersuchung über den Anstieg der Gesamtphosphatase und der hitzestabilen alkalischen Phosphatase in den einzelnen Schwangerschaftswochen



Die Kurven für die Gesamtposphatase und für die hitzestabile alkalische Phosphatase zeigen in ihrer Tendenz einen parallelen Verlauf, so daß man den Anstieg der Gesamtposphatase während der Schwangerschaft auf die Erhöhung der hitzestabilen Fraktion zurückführen muß. Die hitzelabile alkalische Phosphatase kann dagegen über die einzelnen Schwangerschaftswochen hinweg als gleichbleibend hoch angesehen werden, was graphisch im konstanten Abstand der in Fig. 1 dargestellten beiden Kurven zum Ausdruck kommt. Würde die Differenzkurve "Gesamtposphatase minus hitzestabile Phosphatase = hitzelabile Phosphatase" als eigenständige Kurve in Fig. 1 dargestellt, so bestünde sie in einer parallel zur Abszisse verlaufenden geraden Linie.

Der in der Schwangerschaft stark erhöhte Anteil der hitzestabilen alkalischen Phosphatase wird mit der placentaren Phosphatase, einem Zink-Metalloenzym mit einem Molekulargewicht von etwa 116 000 (FISHMAN, siehe dort weitere Literatur) gleichgesetzt. Als Bildungsort nimmt man die oberflächlichen Zellen des zur mütterlichen Seite weisenden Synzytiotrophoblasten an, welche mit placentaren Microvilli in die uterinen Sinusoide ragen und das Enzym in den mütterlichen Kreislauf abgeben (McMASTER et al.). Als physiologische Funktion der placentaren Phosphatase vermutet man eine Beteiligung am aktiven Transport von intermediären Stoffwechselprodukten durch die Placenta (JEACOCK et al., POSEN et al.). Das Enzym wird weitgehend nur in den mütterlichen Kreislauf abgegeben, man spricht von einer placentaren Schranke für das Enzym, weil man auf der Fetalseite im Nabelschnurblut (MERANZE et al., BECK und CLARK, SPEERT et al., AOBA et al.) bzw. im Neugeborenenenserum (McMASTER et al.) nur sehr geringe Mengen hitzestabiler alkalischer Phosphatase gefunden hat.

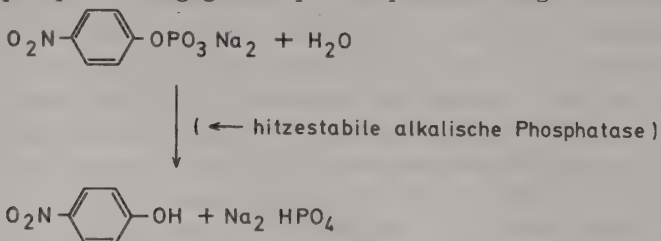
Mit diesem Schrankenmechanismus steht vermutlich in Zusammenhang, daß sich der zonenelektrophoretisch darstellbare reiche Polymorphismus der alkalischen Phosphatase aus Placentaextrakten in Serum der Neugeborenen sowie auch im Serum ihrer Mütter nicht nachweisen läßt (OEPEN und MÜLLER, siehe dort weitere Literatur).

Erwähnenswert erscheint auch der Hinweis, daß die Eigenschaft der Hitzestabilität bei der placentaren Phosphatase ganz spezifisch für die menschliche Species ist (HOTCHKIS et al., unpublished, zit. nach McMASTER et al., POSEN et al.).

## 2. Die Methode von OYA, ASANO und FUWA

Da die hitzestabile alkalische Phosphatase in der Schwangerschaft ansteigt, kann man eine Schwangerschaft feststellen, indem man die erhöhte Enzymaktivität im Blut nachweist. Dieser Nachweis wird mit Hilfe einer Enzymreaktion vorgenommen, bei der ein Farbstoff freigesetzt wird, dessen Extinktion anschließend photometrisch gemessen werden kann.

Im einzelnen gingen OYA, ASANO und FUWA folgendermaßen vor: Ein auf standardisiertem Filterpapier (TOYO Nr.1) aufgebrachter Blutfleck von 2 cm<sup>2</sup> Größe wurde in einem Reagenzglas mit 0,5 ml Glycin-NaOH-MgCl<sub>2</sub>-Puffer (pH 10,4) versetzt. Zur Eliminierung der hitzelabilen alkalischen Phosphatase wurde der Ansatz 30 min bei 56°C im Wasserbad erhitzt. Danach wurde 0,5 ml Substratlösung - bestehend aus 0,4 g Dinatrium-p-Nitrophenylphosphat auf 100 ml 0,001 N HCl - zugegeben und somit die Enzymreaktion in Gang gesetzt. Während dieser Enzymreaktion wurde - katalysiert durch die hitzestabile alkalische Phosphatase - aus der Dinatrium-p-Nitrophenylphosphatlösung gelbes p-Nitrophenol freigesetzt.



Diese Reaktion wurde nach einstündiger Inkubation bei 37°C durch Hinzufügen von 1 ml 10%iger Trichloressigsäure abgebrochen und die Probe 5 min bei 3000 Upm zentrifugiert, um

die als Blutträger fungierenden Filterpapierbestandteile und die denaturierten Serumproteine zu sedimentieren. 1 ml des klaren Überstandes wurde entnommen und mit 4 ml 0,2 n NaOH versetzt.

Die gelbe Farbe des freigesetzten p-Nitrophenols wurde anschließend spektrophotometrisch gemessen (Messung in den eigenen Versuchen bei 405 nm, siehe Kapitel B,4 und C).

Die Autoren konnten das Enzym aus einen Monat alten, 2 cm<sup>2</sup> großen Blutflecken, die etwa 0,5 ml Blut enthielten, nachweisen.

B Versuche mit hämolysefreiem Serum

Modifikation der Methode nach OYA, ASANO und FUWA

1. Grundsätzliche Vorbemerkungen

OYA, ASANO und FUWA untersuchten mit ihrer Methode kein flüssiges Serum, sondern nur Blutflecken.

Um Dosierungsfehler, Verunreinigungen und andere, schwer kontrollierbare und voraussehbare Variable auszuschalten oder gegebenenfalls zu erkennen, sollte die Methode von OYA, ASANO und FUWA in dieser Arbeit nicht nur an Blutflecken, sondern auch an hämolysefreiem und hämolytischem Serum geprüft werden. Um bei den Vorversuchen absolut sicher zu sein, eine große Menge hitzestabiler alkalischer Phosphatase im Serum vorzufinden, wurde Venenblut bzw. das entsprechende Serum verarbeitet, das zum Zeitpunkt der Geburt entnommen worden war. Während OYA, ASANO und FUWA ihre Methode ausschließlich auf die Verwendung von Blutspuren beschränkten und dabei von einer definierten Blutfleckenfläche ausgingen, stellte sich bei der Untersuchung des Serums die Frage nach einer adäquaten Serummenge.

Die Firma BOEHRINGER hat eine "30-min-Methode" zur Bestimmung der alkalischen Phosphatase aus hämolysefreiem Serum entwickelt (Bestell-Nr. 15 987), in der etwa der gleiche Puffer und dasselbe Substrat - allerdings in geringerer Konzentration und mit etwas abweichender Versuchstechnik - verwendet wird: zur Durchführung dieses Tests ist eine Serummenge von 0,1 ml erforderlich. Wegen der methodischen Ähnlichkeit zwischen dem Vorgehen nach OYA, ASANO und FUWA und dem BOEHRINGER-Test wurde für die Serumversuche in dieser Arbeit ebenfalls eine Serummenge von 0,1 ml zugrundegelegt. (Auf die fragliche Möglichkeit der Anwendung des BOEHRINGER-Tests auf die in dieser Arbeit vorgesehenen Untersuchungen wird im Kapitel C der Arbeit noch eingegangen werden.)

## 2. Die Substratkonzentration

Die Substratkonzentration ist bei OYA, ASANO und FUWA mit 0,4 g Dinatrium-p-Nitrophenylphosphat auf 100 ml 0,001 N HCl angegeben, wobei auf die Original-Literatur von BESSEY, LOWRY und BROCK Bezug genommen wird. Die dort beschriebenen Schwierigkeiten mit der Reinheit des Substrats waren für diese Arbeit nicht relevant, da in den vorliegenden Versuchen ein anderes Substrat verwendet wurde, das von der Firma MERCK hergestellte 4-Nitrophenylphosphat-Dinatriumsalz in Form des Hexahydrats (Bestell-Nr. 6850), welches den von BESSEY, LOWRY und BROCK geforderten Ansprüchen genügte, sofern die angesetzte Lösung im Kühlschrank aufbewahrt und wöchentlich frisch angesetzt wurde.

Da bei OYA, ASANO und FUWA eine Substratkonzentration von 0,4 g auf 100 ml angegeben worden war, das in dieser Arbeit verwendete Substrat aber als Hexahydrat vorlag, wurde statt der 0,4 g reiner Substanz 0,443 g des Hexahydrats auf 100 ml verwendet. Von dieser Substratlösung wurde dem Versuchsansatz jeweils 0,5 ml zugesetzt.

## 3. Der Leerwert

Da bei OYA, ASANO und FUWA kein Leerwert angegeben ist, wurde für die vorliegende Arbeit ein Leerwert in der Weise zusammengestellt, wie es in der folgenden kurzen Gegenüberstellung von Leerwert und Probe dargestellt ist:

| <u>Probe</u>                                          | <u>Leerwert</u>                                       |
|-------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|
| 0,1 ml Serum                                          | 0,1 ml Serum                                          |
| +0,5 ml Puffer                                        | +0,5 ml Puffer                                        |
| Eliminierung der hitzestabilen Phosphatase (Erhitzen) | Eliminierung der hitzestabilen Phosphatase (Erhitzen) |
| +0,5 ml Substratlösung                                |                                                       |
| Inkubation zur Enzymreaktion                          | Inkubation zur Enzymreaktion                          |
| +1 ml 10%ige Trichloressigsäure                       | +1 ml 10%ige Trichloressigsäure                       |
|                                                       | → +0,5 ml Substratlösung                              |
| Zentrifugieren                                        | Zentrifugieren                                        |
| 1 ml klare Lösung                                     | 1 ml klare Lösung                                     |
| +4 ml 0,2 N NaOH                                      | +4 ml 0,2 N NaOH                                      |
| Extinktionsmessung Probe                              | gegen Leerwert                                        |

Im Verlauf der Vorversuche drängte sich die Frage auf, ob es unbedingt erforderlich ist, für jede Probe einen entsprechenden eigenen Leerwert anzusetzen. Es wurde deshalb eine Versuchsreihe durchgeführt, bei der die Extinktion gegen den "echten" Leerwert, gegen einen Chemikalienblindwert, gegen Aqua bidest. und gegen Luft gemessen wurde. Der "echte" Leerwert wurde wie oben beschrieben angesetzt. Der Chemikalienblindwert enthielt alle im Versuchsansatz verwendeten Chemikalien in der entsprechenden Menge, jedoch kein Serum. Die erhaltenen Meßwerte sind in der folgenden Tab. 2 wiedergegeben und in Fig. 2a graphisch dargestellt.

Tab. 2, Fig. 2a und 2b:

Teilversuch zur Eliminierung der hitzelabilen Phosphatase, Extinktionsmessung gegen verschiedene Leerwerte

Technische Daten:

Alter der Blutprobe: 6 h  
Serummenge: 0,1 ml hämolysefreies Serum  
Puffer: 0,5 ml Glycin-Puffer, pH 10,5  
Eliminierung der hitzelabilen Phosphatase: 0,10,20 ... 60 min bei 60°C im Warmluftschrank  
Substratkonzentration: 0,5 ml Dinatrium-p-Nitrophenylphosphat (0,4430 g / 100 ml)  
Enzymreaktion: 1 h bei 37°C im Warmluftschrank  
Unterbrechung der Enzymreaktion mit 1 ml 10%iger Trichlor-essigsäure  
Zentrifugieren: 5 min bei 3000 Upm  
Alkalisieren: 1 ml klarer Überstand + 4 ml 0,2 N NaOH  
Leerwert: echter Leerwert (e.L.), Chemikalienblindwert (Ch.Bl.), Aqua bidest, Luft  
Extinktionsmessung: bei 405 nm im Eppendorf-Photometer (siehe Kapitel B,4), im Spektralphotometer von 360-450 nm.

Tab. 2

| Erhitzungszeit<br>in min | Extinktionsmessung Probe<br>gegen: |        |                |       | Extinktions-<br>messung<br>e.L. gegen<br>Ch.Bl. |
|--------------------------|------------------------------------|--------|----------------|-------|-------------------------------------------------|
|                          | e.L.                               | Ch.Bl. | Aqua<br>bidest | Luft  |                                                 |
| 0                        | 0,631                              | 0,652  | 0,680          | 0,730 | 0,022                                           |
| 10                       | 0,338                              | 0,352  | 0,380          | 0,428 | 0,017                                           |
| 20                       | 0,254                              | 0,270  | 0,295          | 0,346 | 0,016                                           |
| 30                       | 0,236                              | 0,259  | 0,287          | 0,336 | 0,022                                           |
| 40                       | 0,243                              | 0,260  | 0,288          | 0,338 | 0,013                                           |
| 50                       | 0,216                              | 0,229  | 9,258          | 0,307 | 0,014                                           |
| 60                       | 0,216                              | 0,225  | 0,255          | 0,305 | 0,011                                           |

Extinktionsmessung

Chemikalienblindwert gegen Aqua bidest 0,029

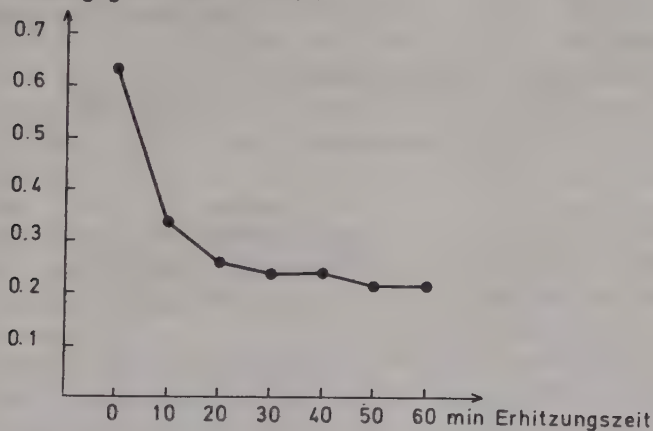
Chemikalienblindwert gegen Luft 0,080

Aqua bidest gegen Luft 0,052

Fig. 2a

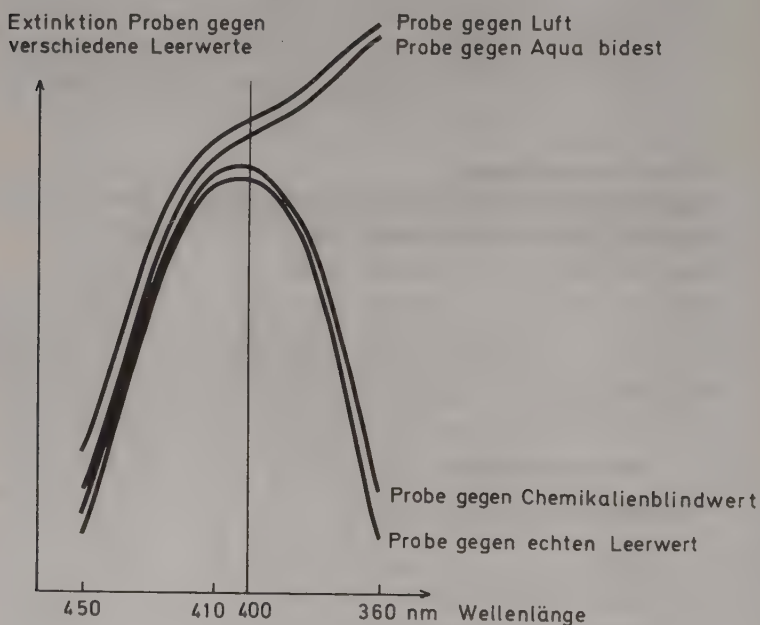
Extinktionsmessung

Probe gegen echten Leerwert



Die nichterhitzte Probe aus Tab. 2 wurde zusätzlich im Spektralphotometer gegen die verschiedenen Leerwerte im Bereich zwischen 450 und 360 nm gemessen, was zu folgendem Spektrum führte (Fig. 2b):

Fig. 2b



Aus dem Vergleich der Meßwerte gegen die verschiedenen Leerwerte, wie auch aus der graphischen Darstellung durch das Spektralphotometer läßt sich folgendes Ergebnis dieses Teilversuchs entnehmen:

Meßwerte gegen den Chemikalienblindwert sind größer als diejenigen gegen echte Leerwerte, da bei letzteren das Serum (trotz Abzentrifugierens der durch die Trichloressigsäure ausgefällten Serumproteine, eventuell in Form von gelösten

Salzen) als zusätzliche Substanz mit eingeht. Hierdurch wird eine etwas stärkere Extinktion bewirkt, was sich bei der photometrischen Differenzmessung in kleineren Meßwerten niederschlägt.

Die Meßwerte gegen Aqua bidest. sind noch größer, da hier die Substanzen des Chemikalienblindwertes fehlen, die gegenüber Aqua bidest. bereits eine gewisse Lichtabsorption bewirken.

Die Meßwerte gegen Luft sind die höchsten und größer als diejenigen gegen Aqua bidest., da Luft eine geringere physikalische Dichte als Aqua bidest. aufweist, was sich photometrisch in geringerer Extinktion des Leerwertes und damit in höheren Meßwerten zeigt.

Es ergibt sich nun als Folgerung, daß bei Versuchen, bei denen es auf absolute Werte des freigesetzten p-Nitrophenols ankommt, das Ansetzen eines echten Leerwertes angebracht erscheint. Kommt es aber lediglich darauf an, bestimmte Tendenzen oder lineare oder unlineare Zusammenhänge aufzuzeigen (vgl. Fig. 2a), so genügt eine Messung gegen den Chemikalienblindwert. Der dadurch in Kauf genommene Fehler ist systematischer Art und, wie aus der Meßreihe "echter Leerwert gegen Chemikalienblindwert" der Tabelle 2 hervorgeht, nur sehr gering.

Die bisher gegebene Ergebnisinterpretation setzte eine photometrische Messung bei etwa 400 nm voraus (die Meßwerte der Tab. 2 wurden bei 405 nm ermittelt), da in diesem Bereich für die gelbe Farbe des bei der Enzymreaktion freigesetzten p-Nitrophenols ein Extinktionsmaximum besteht.

Ein Nebenfund, der aus den Meßwerten der vorausgehenden Tab. 2 nicht zu ersehen ist, wird in den graphischen Aufzeichnungen des Spektralphotometers deutlich (vgl. Fig. 2b): Nur Meßwerte gegen den echten Leerwert oder einen Chemikalienblindwert ergeben bei spektralphotometrischer Messung ein eindeutiges Maximum bei etwa 405 nm, während die Kurven bei Messung gegen Aqua bidest. und Luft weiter ansteigen, da hier die Extinktion der Chemikalien, besonders des p-Nitrophenylphosphates photometrisch nicht abgezogen wird. Daher

wurde von einer Messung gegen Aqua bidest. oder Luft nicht nur wegen des aus der Tab. 2 ersichtlichen beträchtlich größeren konstanten Meßfehlers, sondern auch auf Grund der spektralphotometrischen Befunde Abstand genommen.

#### 4. Die Wellenlänge bei der Extinktionsmessung

Nach Zufügen der Natronlauge maßen OYA, ASANO und FUWA die Extinktion des bei der Enzymreaktion freigewordenen gelben Farbstoffes p-Nitrophenol im alkalischen Milieu mit Hilfe eines Spektralphotometers bei einer Wellenlänge von 415 nm. In dem Teilversuch des vorausgehenden Kapitels B,3 (vgl. Fig. 2b) wurden Extinktionsmessungen spektralphotometrisch im Bereich zwischen 360 und 450 nm graphisch aufgezeichnet. Aus der vorliegenden Kurve läßt sich ersehen, daß ein Extinktionsmaximum für die gelbe Farbe des freigesetzten p-Nitrophenols bei etwa 405 nm liegt. Eine Messung bei 415 nm soll nach BESSEY, LOWRY und BROCK in der von den Autoren verwendeten Methodik den Vorteil haben, daß bei leichter Hämolyse des Serums die Extinktion des freiwerdenden Hämoglobins nicht so stark mit in die Messung eingeht (siehe auch Kapitel C). Da ein Eppendorf-Photometer im Gegensatz zum Spektralphotometer zeitlich unbeschränkt zur Verfügung stand, wurden die Messungen an diesem Gerät mit einem Quecksilber-Filter für 405 nm vorgenommen, zumal dieses Vorgehen auch im BOEHRINGER-Test empfohlen wird (siehe auch Kapitel C).

Zur photometrischen Extinktionsmessung wurden Glasküvetten mit einer Schichtdicke von 1 cm verwendet.

#### 5. Der Puffer und sein pH-Wert

Der von OYA, ASANO und FUWA verwendete Puffer ist in der Originalliteratur bei BESSEY, LOWRY und BROCK beschrieben. Er besteht aus 0,1 M Glycin, 0,001 M  $MgCl_2$  und 0,085 M NaOH.

DELORY und KING weisen darauf hin, daß Glycin in hohen Konzentrationen, wie sie später von BESSEY, LOWRY und BROCK

verwendet werden, einen hemmenden Einfluß auf die alkalische Phosphatase besitzt und stellen gleichzeitig einen eigenen Carbonat-Bicarbonat-Puffer vor. Beide Substanzen werden als 0,1 M Lösungen angesetzt. Durch Mischung verschieden großer Anteile beider Komponenten ließ sich bei DELORY und KING eine pH-Variation des Puffers von 9,16 bis 10,83 bei 20°C erreichen. Beim Nachvollziehen der Methode für die vorliegende Arbeit ergab sich ebenfalls eine pH-Variation von 9,2 bis 10,85 bei Zimmertemperatur.

Da von BESSEY, LOWRY und BROCK für die alkalische Phosphatase ein Wirkungsoptimum bei pH 10,0 - 10,1 angegeben wird und die Einhaltung dieses pH-Optimums als sehr kritisch bezeichnet wird, da außerdem aber der von den Autoren verwendete Glycin-Puffer einen pH von 10,4 (nach eigener Herstellung und pH-Messung bei Zimmertemperatur einen pH von 10,5) besitzt, erschien es von großem Interesse, nicht nur die von der Substanz her unterschiedlichen Pufferarten miteinander zu vergleichen, sondern gleichzeitig durch pH-Variation des Carbonat-Puffers das Wirkungsoptimum für die alkalische Phosphatase in einem eigenen Teilversuch zu kontrollieren.

Die Ergebnisse der Untersuchung sind in der folgenden Tab. 3 und Fig. 3 wiedergegeben.

#### Tab. 3 und Fig. 3

Versuch über den Einfluß des Puffers und seines pH-Wertes

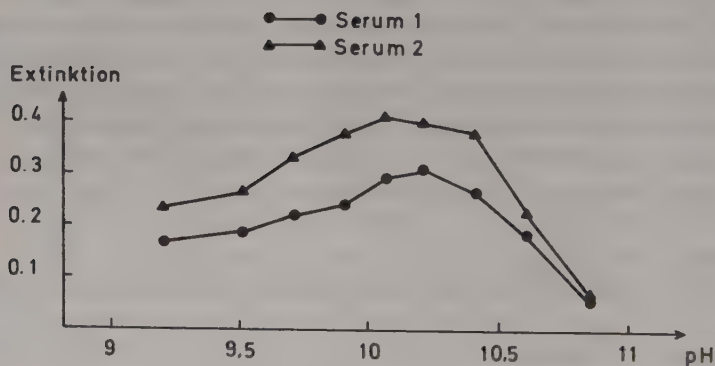
#### Technische Daten:

Alter der Blutproben: 12 h  
Serummenge: 0,1 ml hämolysefreies Serum  
Puffer: 0,5 ml Glycin-Puffer/Carbonat-Puffer  
Eliminierung der hitzelabilen Phosphatase: 40 min bei 60°C im Warmluftschrank  
Substratkonzentration: 0,5 ml Dinatrium-p-Nitrophenylphosphat (0,4430 g / 100 ml)  
Enzymreaktion: 1 h bei 37°C im Warmluftschrank  
Unterbrechung der Enzymreaktion mit 1 ml 10%iger Trichloressigsäure  
Zentrifugieren: 5 min bei 3000 Upm  
Alkalisieren: 1 ml klarer Überstand + 4 ml 0,2 N NaOH  
Leerwert: echter Leerwert (e.L.), Chemikalienblindwert (Ch.Bl.)  
Extinktionsmessung: bei 405 nm im Eppendorf-Photometer

Tab. 3

| Puffer Nr. | Carbonat :<br>Bicarbonat | pH    | Serum 1 | Serum 2 |
|------------|--------------------------|-------|---------|---------|
| 1          | 1 : 9                    | 9,2   | 0,171   | 0,237   |
| 2          | 2 : 8                    | 9,5   | 0,189   | 0,270   |
| 3          | 3 : 7                    | 9,7   | 0,221   | 0,338   |
| 4          | 4 : 6                    | 9,9   | 0,249   | 0,379   |
| 5          | 5 : 5                    | 10,05 | 0,293   | 0,413   |
| 6          | 6 : 4                    | 10,2  | 0,303   | 0,400   |
| 7          | 7 : 3                    | 10,4  | 0,273   | 0,381   |
| 8          | 8 : 2                    | 10,6  | 0,185   | 0,234   |
| 9          | 9 : 1                    | 10,85 | 0,052   | 0,058   |
| 10         | Glycin-Puffer            | 10,5  | 0,176   | 0,230   |

Fig. 3



Als Ergebnisinterpretation dieser Versuchsserien lassen sich folgende Resultate hervorheben:

Das Wirkungsoptimum für die hitzestabile alkalische Phosphatase liegt bei den in dieser Untersuchung verwendeten Versuchsbedingungen etwa bei pH 10,1 - 10,2.

Da eine pH-Variation für den Glycin-Puffer nach BESSEY, LOWRY und BROCK nicht vorgesehen war, wurden etwa pH-gleiche Meßwerte beider Pufferarten miteinander verglichen:

Dabei zeigte sich, daß bei etwa gleichem pH-Wert (10,4 - 10,6) die Meßwerte des Carbonat-Puffers höher ausfallen als die entsprechenden Werte des Glycin-Puffers mit pH 10,5. Vergleicht man gar die Werte des Carbonat-Puffers im pH-Optimum 10,2 mit den Werten des Glycin-Puffers bei 10,5, so wird eine noch erheblichere Diskrepanz der Meßwerte zugunsten des Carbonat-Puffers deutlich.

Die Ergebnisse dieses Teilversuchs lassen die von DELORY und KING erhobenen Einwände bezüglich eines hemmenden Einflusses des Glycins auf die Phosphataseaktivität (bzw. eines die Extinktionswerte mindernden Einflusses) als berechtigt erscheinen. Die Überlegenheit des Carbonat-Puffers in diesem Teilversuch soll zum Anlaß genommen werden, diesen Puffer neben dem weiter zu verwendenden Glycin-Puffer unter den im folgenden zu überprüfenden Versuchsbedingungen auf seine weitere Bewährung durch parallel verlaufende Versuchsserien zu untersuchen.

Bei der weiteren Verwendung des Carbonat-Puffers soll dieser in einer Mischung der Komponenten im Verhältnis 1 : 1 und einem pH-Wert von 10,05 herangezogen werden, da bei gleichen Anteilen der Substanzen Carbonat/Bicarbonat auch eine maximale Pufferkapazität in beiden Richtungen erwartet wird.

## 6. Eliminierung der hitzelabilen Phosphatase

OYA, ASANO und FUWA eliminierten die hitzelabile alkalische Phosphatase durch Erhitzen des Probenansatzes über 30 min bei 56°C im Wasserbad. Die nach dieser Wärmebehandlung verbleibende alkalische Phosphatase wurde als die zu untersuchende hitzestabile Phosphatase angesehen.

Da für die Versuchsanordnung in dieser Arbeit kein Wasserbad zur Verfügung stand, wurde ein Warmluftschrank verwendet, der auf 60°C eingestellt war. Es sollte mit den vorhandenen Mitteln der zeitliche Ablauf der Eliminierung unter den geänderten Bedingungen untersucht und graphisch dargestellt werden.

Es wurden mehrere Proben desselben Serums in den Warmluftschrank bei 60°C zur Eliminierung der hitzelabilen Phosphatase eingestellt, in 10minütigem Abstand nacheinander wieder entnommen und dem weiteren Untersuchungsablauf unterzogen.

Wie angekündigt, wurde der Glycin-Puffer neben dem Carbonat-Puffer verwendet. Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe sind in der folgenden Tab. 4 und Fig. 4 wiedergegeben.

Tab. 4 und Fig. 4:

Versuch zur Eliminierung der hitzelabilen Phosphatase

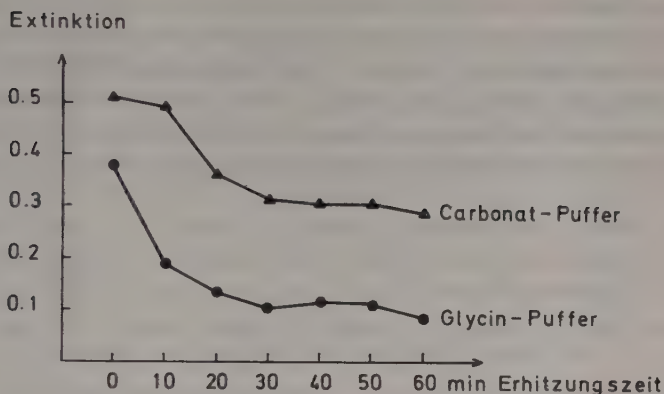
Technische Daten:

Alter der Blutprobe: 1 h  
 Serummenge: 0,1 ml hämolysefreies Serum  
 Puffer: 0,5 ml Glycin-Puffer / Carbonat-Puffer  
 Eliminierung der hitzelabilen Phosphatase: 0,10,20 ... 60 min bei 60°C im Warmluftschrank  
 Substratkonzentration: 0,5 ml Dinatrium-p-Nitrophenylphosphat (0,4430 g / 100 ml)  
 Enzymreaktion: 1 h bei 37°C im Warmluftschrank  
 Unterbrechung der Enzymreaktion mit 1 ml 10%iger Trichlor-essigsäure  
 Zentrifugieren: 5 min bei 3000 Upm  
 Alkalisieren: 1 ml klarer Überstand + 4 ml 0,2 N NaOH  
 Leerwert: Chemikalienblindwert (Ch.Bl.), jeweils dem verwendeten Puffer entsprechend  
 Extinktionsmessung: bei 405 nm im Eppendorf-Photometer

Tab. 4

| Erhitzungszeit/min | Glycin-Puffer | Carbonat-Puffer |
|--------------------|---------------|-----------------|
| 0                  | 0,383         | 0,512           |
| 10                 | 0,194         | 0,499           |
| 20                 | 0,139         | 0,364           |
| 30                 | 0,103         | 0,319           |
| 40                 | 0,112         | 0,305           |
| 50                 | 0,106         | 0,305           |
| 60                 | 0,090         | 0,295           |

Fig. 4



Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe lassen sich folgendermaßen interpretieren: Während beim Glycin-Puffer nach einsetzender Erhitzung ein sofortiger Abfall der hitzelabilen Phosphatase einsetzt, bedarf es beim Carbonat-Puffer einer gewissen Einwirkdauer der Hitze, bis dann auch hier eine rasche Eliminierung der hitzelabilen Phosphatase eintritt. Der Unterschied im Anfangsbereich der Kurve kann mit dem Hinweis von DELORY und KING auf einen die Extinktionswerte mindernden Einfluß des Glycins in Zusammenhang stehen.

Der steile Abfall der Kurven geht allmählich in einen flachen Verlauf über, wenn die Proben weitgehend nur noch hitzestabile Phosphatase enthalten, da diese offenbar auch länger einwirkende Erhitzung verträgt.

Es wurde an Hand der erhaltenen Kurven festgelegt, daß die Eliminierung der hitzelabilen Phosphatase nach einer Erhitzungszeit von 40 min bei 60°C im Warmluftschrank als abgeschlossen angesehen werden kann. Möglicherweise ist das bereits bei einer Erhitzungsdauer von 30 min der Fall. Bei der

40minütigen Erhitzung kann man jedoch noch sicherer sein, alle hitzelabile Phosphatase inaktiviert zu haben. Dagegen kann die Gefahr der Zerstörung der hitzestabilen Phosphatase, die man erhalten und untersuchen möchte, als gering betrachtet werden, was aus dem flachen Verlauf der Kurve über eine 30minütige Erhitzungsdauer hinaus zum Ausdruck kommt.

Als interessanter und deutlicher Nebebefund soll festgehalten werden, daß der Carbonat-Puffer in diesem Teilversuch ebenso wie bei den vorausgehenden Vorversuchen zu höheren Extinktionswerten führt als der Glycinpuffer.

## C Versuch mit hämolytischem Serum

### Einfluß von gelösten Serumproteinen und der Hämolys

Im Laufe der Serumversuche stellte sich die Frage, ob das in der Technik von OYA, ASANO und FUWA vorgeschriebene Zentrifugieren unbedingt notwendig ist. In Parallelversuchen stellte sich heraus, daß die bei Zugabe der Trichloressigsäure ausfallenden Serumproteine nach Zufügen der Natronlauge wieder in Lösung gehen und eine homogene, optisch klare Lösung entsteht, die für eine photometrische Messung geeignet erscheint. Der Fortfall des Zentrifugierens brächte eine wesentliche Arbeitersparnis, da außer dem Vorgang des Zentrifugierens selbst auch die Entnahme des 1 ml klaren Überstandes entfielen und darüber hinaus für eine Probe oder einen echten Leerwert je ein Röhrchen eingespart werden könnte, was bei der Vielzahl der anfallenden Messungen eine erhebliche Vereinfachung bedeuten würde. Eine Überprüfung des handelsüblichen BOEHRINGER-Tests ergab, daß auch dort auf ein Zentrifugieren verzichtet wird und die Serumproteine mit in die Messung eingehen.

Es erschien deshalb von großem Interesse, den Einfluß eventuell vorhandener gelöster Serumproteine auf die Meßwerte zu überprüfen. Es wurden daher von einem bestimmten Serum zwei Proben mit den echten Leerwerten angesetzt, von denen die eine zentrifugiert wurde, die andere mit den ausgefällten Proteinen gut durchmischt wurde. Um vergleichbare Meßwerte zu erhalten, wurde die nicht zentrifugierte Probe und der entsprechende Leerwert nicht in ihrer Gesamtheit verwendet, sondern es wurde wie bei der zentrifugierten Vergleichsprobe 1 ml entnommen und mit 4 ml 0,2 N NaOH versetzt. Hierzu muß angemerkt werden, daß bei der Entnahme von 1 ml aus den 2 ml umfassenden klumpig-trüben, unzentrifugierten Lösungen eine exakte Teilung der Proteine nicht erfolgen konnte, ein Fehler, der durch gutes Durchschütteln der inhomogenen Lösungen möglichst gering gehalten werden sollte. Dieses Problem würde sich erübrigen, wenn sich als Ergebnis dieses Versuchs nur ein geringer Einfluß der gelösten Serumproteine auf die Meßwerte ergäbe, da dann nicht nur 1 ml der trüben Lösung, sondern der

gesamte Probenansatz verwendet werden könnte. Die Entnahme des 1 ml in diesem Versuch ist lediglich erforderlich, um durch Gegenüberstellung mit dem Meßwert aus 1 ml klarer zentrifugierter Lösung vergleichbare Ergebnisse zu erhalten.

Neben dem Einfluß gelöster Serumproteine war auch der Einfluß der Hämolyse von Interesse, und zwar im Hinblick auf den noch zu führenden Nachweis der hitzestabilen alkalischen Phosphatase aus Blutflecken. Da bei Verwendung von Blutflecken die exakte Herstellung absolut gleich großer Blutflecken und darüber hinaus die völlig gleichmäßige Durchtränkung des verwendeten Blutfleckenträgers fraglich erschien, sollte der Hämolyseeinfluß auf die Meßergebnisse zuvor unter weitgehend kontrollierbaren Versuchsbedingungen an hämolytischen Seren untersucht werden und mit den Ergebnissen parallel laufender Versuche an nichthämolytischen Seren verglichen werden.

Hierzu wurde aus zentrifugierten Blutproben zunächst nicht-hämolytisches Serum entnommen. Das restliche Serum wurde mit den Erythrozyten solange mit einem Glasstab verrührt, bis nach erneutem Zentrifugieren eine makroskopisch deutliche Hämolyse zu erkennen war. Nach Abziehen des hämolytischen Serums konnte man sich durch erneutes Zentrifugieren vergewissern, daß keine zentrifugierbaren korpuskulären Elemente mehr enthalten waren, sondern ein homogen-hämolytisches Serum vorlag, was zur vergleichenden Untersuchung mit dem reinen Serum herangezogen wurde.

Da auch bei den Versuchen mit hämolytischem Serum zentrifugierte und nicht-zentrifugierte Proben angesetzt wurden und sowohl bei reinem wie auch bei hämolytischem Serum die beiden unterschiedlichen Puffer (Glycin- und Carbonat-Puffer) parallel verwendet wurden, ergab sich eine Fülle von Vergleichsmöglichkeiten zwischen den einzelnen Extinktionswerten.

Die Ergebnisse dieses Versuchs sind in der folgenden Tab.5 wiedergegeben.

Tab. 5:

Vergleichender Versuch von hämolysefreiem und hämolytischem Serum

Technische Daten:

Alter der Blutproben: Serum 1: 2 Tage  
 Serum 2: 2 Tage  
 Serum 3: 1 Tag  
 Serum 4: 1 Tag  
 Serummenge: 0,1 ml hämolysefreies/hämolytisches Serum  
 Puffer: 0,5 ml Glycin-Puffer / Carbonat-Puffer  
 Eliminierung der hitzelabilen Phosphatase: 40 min bei 60°C im Warmluftschrank  
 Substratkonzentration: 0,5 ml Dinatrium-p-Nitrophenylphosphat (0,4430 g / 100 ml)  
 Enzymreaktion: 1 h bei 37°C im Warmluftschrank  
 Unterbrechung der Enzymreaktion mit 1 ml 10%iger Trichlor-essigsäure  
 Zentrifugieren: 5 min bei 3000 Upm / nicht Zentrifugieren  
 Alkalisieren: 1 ml klarer Überstand / trübe Lösung + 4 ml 0,2 N NaOH  
 Leerwert: echter Leerwert (e.L.), Chemikalienblindwert (Ch.Bl.)  
 Extinktionsmessung bei 405 nm im Eppendorf-Photometer

Abkürzungen:

Pr.z. = Probe zentrifugiert  
 Pr.nz. = Probe nicht zentrifugiert  
 e.L.z. = echter Leerwert, zentrifugiert  
 e.L.nz. = echter Leerwert, nicht zentrifugiert  
 Ch.Bl. = Chemikalienblindwert

| Serum 1        | hämolysefreies Serum |                 | hämolytisches Serum |                 |
|----------------|----------------------|-----------------|---------------------|-----------------|
|                | Glycin-Puffer        | Carbonat-Puffer | Glycin-Puffer       | Carbonat-Puffer |
| Pr.z./e.L.z.   | 0,485                | 0,758           | 0,444               | 0,705           |
| Pr.nz./e.L.nz. | 0,476                | 0,762           | 0,550               | 0,740           |
| Pr.z./Ch.Bl.   | 0,518                | 0,770           | 0,464               | 0,730           |
| Pr.nz./Ch.Bl.  | 0,525                | 0,802           | 0,618               | 0,810           |
| e.L.z./Ch.Bl.  | 0,017                | 0,012           | 0,016               | 0,012           |
| e.L.nz./Ch.Bl. | 0,042                | 0,038           | 0,075               | 0,072           |

| Serum 2        | hämolysefreies Serum |                 | hämolytisches Serum |                 |
|----------------|----------------------|-----------------|---------------------|-----------------|
|                | Glycin-Puffer        | Carbonat-Puffer | Glycin-Puffer       | Carbonat-Puffer |
| Pr.z./e.L.z.   | 0,352                | 0,698           | 0,360               | 0,666           |
| Pr.nz./e.L.nz. | 0,349                | 0,660           | 0,317               | 0,675           |
| Pr.z./Ch.Bl.   | 0,366                | 0,710           | 0,379               | 0,680           |
| Pr.nz./Ch.Bl.  | 0,395                | 0,715           | 0,394               | 0,740           |
| e.L.z.:Ch.Bl.  | 0,015                | 0,011           | 0,015               | 0,012           |
| e.L.nz./Ch.Bl. | 0,048                | 0,041           | 0,073               | 0,067           |

Serum 3

|                |       |       |       |       |
|----------------|-------|-------|-------|-------|
| Pr.z./e.L.z.   | 0,190 | 0,348 | 0,168 | 0,355 |
| Pr.nz./e.L.nz. | 0,169 | 0,357 | 0,165 | 0,396 |
| Pr.z./Ch.Bl.   | 0,201 | 0,354 | 0,181 | 0,369 |
| Pr.nz./Ch.Bl.  | 0,204 | 0,391 | 0,227 | 0,461 |
| e.L.z./Ch.Bl.  | 0,012 | 0,012 | 0,010 | 0,011 |
| e.L.nz./Ch.Bl. | 0,038 | 0,034 | 0,064 | 0,065 |

Serum 4

|                |       |       |       |       |
|----------------|-------|-------|-------|-------|
| Pr.z./e.L.z.   | 0,256 | 0,455 | 0,263 | 0,496 |
| Pr.nz./e.L.nz. | 0,297 | 0,579 | 0,326 | 0,531 |
| Pr.z./Ch.Bl.   | 0,267 | 0,467 | 0,273 | 0,510 |
| Pr.nz./Ch.Bl.  | 0,339 | 0,630 | 0,442 | 0,656 |
| e.L.z./Ch.Bl.  | 0,008 | 0,011 | 0,009 | 0,011 |
| e.L.nz./Ch.Bl. | 0,042 | 0,045 | 0,118 | 0,117 |

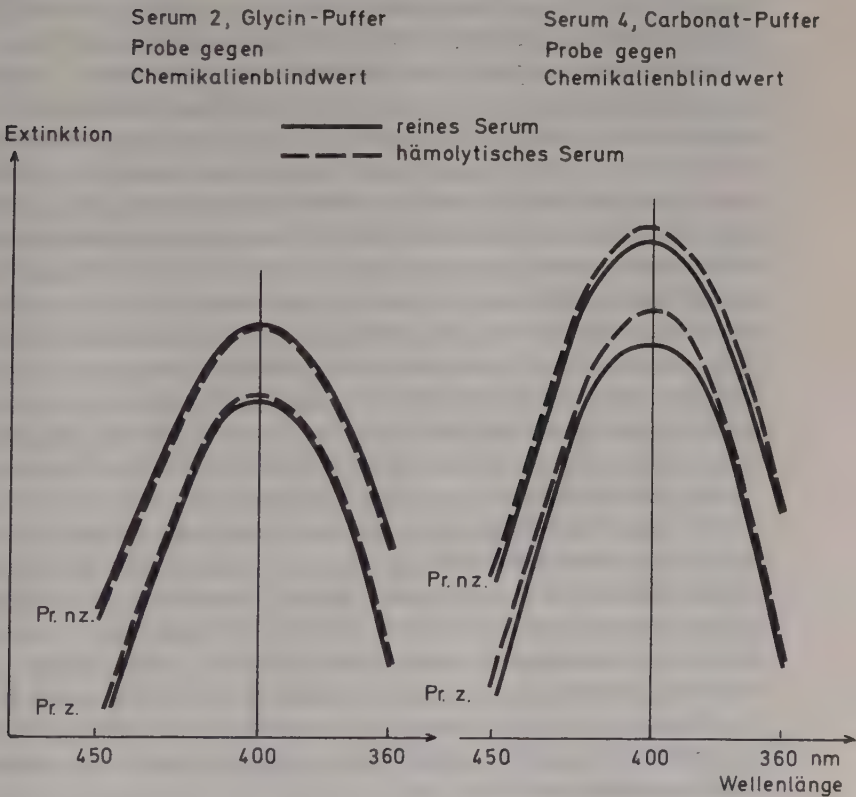
Neben der photometrischen Messung mit dem Eppendorf-Photometer wurden einzelne Proben hämolysefreien Serums mit hämolytischem Serum und darüber hinaus nicht-zentrifugierte mit zentrifugierten Proben spektralphotometrisch miteinander verglichen (vgl. Fig. 5). Es sollte damit geprüft werden, ob bei den verwendeten Hämolysegraden irgendein Einfluß auf das Absorptionsmaximum im gelben Bereich nachweisbar ist. Das bei der Enzymreaktion freiwerdende gelbe p-Nitrophenol hat sein Absorptionsmaximum bei etwa 400-405 nm. Wie oben bereits erwähnt, weisen BESSEY, LOWRY und BROCK darauf hin, daß in der von ihnen verwendeten Technik die Hämolyse einen Einfluß auf die Extinktions-Meßwerte haben kann und empfehlen deshalb eine Messung bei 415 nm; bei dieser Wellenlänge

soll sich ein Hämolyseeinfluß weniger stark auf die Meßwerte auswirken.

Die spektralphotometrischen Ergebnisse sind in Fig. 5 zusammengefaßt.

Fig. 5:

Spektralphotometrischer Vergleich zwischen Extinktionswerten aus hämolysefreiem Serum und hämolytischem Serum



Interpretation dieser Ergebnisse:

Zunächst kann festgestellt werden, daß die Proben des Carbonat-Puffers auch hier höhere Extinktionswerte zeigen als die Proben des Glycin-Puffers, was für eine bessere Eignung des Carbonat-Puffers spricht.

Ferner wird deutlich, daß gegen den Chemikalienblindwert gemessene Probenwerte größer ausfallen als die entsprechenden Messungen gegen den jeweiligen echten Leerwert. Dieses Phänomen wurde bereits in Kapitel B,3 S.18/19 damit erklärt, daß im echten Leerwert gegenüber dem Chemikalienblindwert zusätzlich das Serum enthalten ist, welches geringfügig stärkere Lichtabsorption bewirkt, was bei der photometrischen Differenzmessung geringere Probenmeßwerte zur Folge hat.

Um den Einfluß gelöster Serumproteine abzuklären, müssen die Meßwerte nicht-zentrifugierter mit denen zentrifugierter Proben verglichen werden, wobei zunächst die Messung gegen den Chemikalienblindwert betrachtet werden soll. Es zeigt sich, daß die nicht-zentrifugierten Probenwerte stets größer sind als die entsprechenden zentrifugierten Vergleichsproben. Die Ursache dafür kann nur darin gesehen werden, daß bei nicht-zentrifugierten Proben die Serumproteine mit in die Messung eingehen und eine Verfälschung im Sinne einer Erhöhung verursachen. Diese Erhöhung des Meßwertes erklärt sich dadurch, daß die in der Lösung zusätzlich enthaltenen gelösten Proteine ein optisch dichteres Medium darstellen und damit zu höheren Extinktionswerten führen als die Vergleichslösung ohne diese Proteine. Bei Messung derselben Proben nicht gegen den Chemikalienblindwert, sondern gegen den jeweiligen echten Leerwert lassen sich diese Ergebnisse nicht in so klarer Weise bestätigen. Diese Tatsache läßt sich damit erklären, daß es bei den nicht-zentrifugierten Proben und den entsprechenden Leerwerten - wie am Beginn dieses Kapitels erwähnt S.27 - nicht möglich ist, eine exakt gleiche Dosierung des Gehalts an Proteinen durchzuführen, was in der klumpigen Inhomogenität der unzentrifugierten Lösungen begründet ist.

Eine durch gelöste Proteine bedingte Fehlerstreuung macht

sich also nicht nur in nicht-zentrifugierten Proben, sondern auch in den zugehörigen nicht-zentrifugierten Leerwerten bemerkbar, wobei sich bei Messung der Proben gegen die entsprechenden echten Leerwerte die Fehler durch gelöste Proteine einmal addieren, ein anderes Mal subtrahieren können. Es ist z.B. möglich, daß eine nicht-zentrifugierte Probe zufällig wenig Protein enthält, der entsprechende Leerwert aber zufällig relativ viel Protein enthält. Der Leerwert wird also bei der Null-Einstellung der Photometerskala bereits relativ viel Licht absorbieren, was bei der photometrischen Differenzmessung zu einem relativ niedrigen Meßwert führen wird, zumal im angenommenen Beispiel die entsprechende Probe gerade wenig Protein enthalten sollte. Diese im Beispiel beschriebene zufällige Verteilung von mehr oder weniger Protein in Probe bzw. Leerwert führt bei Messung gegeneinander zu einem relativ niedrigen Meßwert, der im Vergleich zu dem entsprechenden Meßwert der zentrifugierten Probe gegen entsprechenden Leerwert niedriger ausfallen kann. Bei Messung der Proben gegen den Chemikalienblindwert ist der die Proteine betreffende Dosierungsfehler nur in der Probe enthalten und kann sich nicht mit einem Leerwertfehler addieren oder subtrahieren, weshalb die Messungen gegen den Chemikalienblindwert für die Ergebnisinterpretation geeigneter erscheinen. Die in diesem Absatz gemachten Ausführungen treffen für reines Serum ebenso wie für hämolytisches Serum zu, d.h. ein Einfluß gelöster Serumproteine macht sich sowohl bei Proben mit reinem Serum als auch bei Proben mit hämolytischem Serum bemerkbar.

Zur Klärung des Hämolyseeinflusses auf die Meßwerte müssen die Meßwerte des hämolysefreien Serums mit denen des hämolytischen Serums verglichen werden, wobei es notwendig ist, nur die zentrifugierten Meßreihen zu vergleichen, da bei ihnen der überlagernde Einfluß der Serumproteine ausgeschaltet ist. Die Überprüfung zeigt, daß eine systematische Meßwerterhöhung oder -erniedrigung beim hämolytischen Serum gegenüber dem reinen Serum nicht gegeben ist. Ein deutlicher und starker Hämolyseeinfluß ist anscheinend mit Hilfe dieses Meßwertvergleichs nicht nachweisbar.

Neben dem Vergleich von Probenmessungen gegen entsprechende echte Leerwerte bzw. Chemikalienblindwerte zur Darstellung des Einflusses von Serumproteinen bzw. der Hämolyse erscheinen jedoch in besonderem Maße die Messungen der Leerwerte gegen den Chemikalienblindwert dazu geeignet zu sein, eine Versuchsinterpretation zu geben, da gerade die Leerwerte - ohne den eventuell störenden Einfluß einer abgelaufenen Enzymreaktion mit der damit verbundenen Freisetzung eines Farbstoffes - in der Lage sind, ganz speziell einen Hämolyse- oder Proteineinfluß darzulegen, denn auch in die echten Leerwerte gehen die gelösten Serumproteine bzw. die Hämolyse mit ein.

Zur Untersuchung des Hämolyseeinflusses in den echten Leerwerten empfiehlt es sich, die zentrifugierten Proben der echten Leerwerte zu betrachten, da bei ihnen durch das Zentrifugieren der mögliche Einfluß gelöster Serumproteine ausgeschaltet ist. Es zeigt sich, daß die Extinktionsbeträge der zentrifugierten echten Leerwerte bei Messung gegen den Chemikalienblindwert sowohl bei reinem Serum als auch bei hämolytischem Serum und darüber hinaus bei beiden verwendeten Puffern in derselben Größenordnung liegen. Ein Hämolyseeinfluß ist aus dieser vergleichenden Betrachtung nicht abzuleiten.

Um einen Einfluß der gelösten Serumproteine auf die Meßergebnisse festzustellen, müssen die gegen den Chemikalienblindwert gemessenen nicht-zentrifugierten echten Leerwerte mit den zentrifugierten echten Leerwerten verglichen werden, wobei zunächst die Ergebnisse des reinen Serums betrachtet werden sollen, um eine mögliche hämolysebedingte Meßwertverfälschung auszuschließen. Es zeigt sich, daß die Zahlenwerte der nicht-zentrifugierten Leerwerte stets weit mehr als doppelt so groß ausfallen wie die Vergleichszahlen der zentrifugierten Leerwerte. Dieser Effekt ist offenbar auf die im nicht-zentrifugierten Leerwert enthaltenen gelösten Serumproteine zurückzuführen.

Während sich beim Vergleich der zentrifugierten Leerwerte zwischen reinem Serum und hämolytischem Serum kein Unterschied in der Größenordnung des Extinktionsbetrages erkennen ließ, wird bei der entsprechenden Betrachtung der nicht-zen-

trifugierten Leerwerte eine drastische Erhöhung der Extinktionswerte beim hämolytischen Serum deutlich. Obwohl es sich hier um einen Vergleich der nicht-zentrifugierten Leerwerte zwischen reinem und hämolytischem Serum handelt, wäre es sicherlich falsch, die Meßwerterhöhung beim hämolytischen Serum auf die rötlich-hämolytische Farbe des verwendeten Serums zurückzuführen, da diese durch Zugabe der Trichloressigsäure verschwindet; außerdem müßte ein Einfluß der rötlichen Hämolysefarbe dann auch bei den zentrifugierten Leerwerten zur Auswirkung kommen. Es erscheint vielmehr sinnvoll, die gefundenen Meßwerterhöhungen beim hämolytischen Serum ebenfalls auf den Einfluß gelöster Serumproteine zurückzuführen: Man kann davon ausgehen, daß die durch Hämolyse freigewordenen Substanzen ebenfalls Proteinnatur besitzen, die nach Zugabe der Trichloressigsäure denaturiert werden und dann als zusätzlich im Versuchsansatz vorhandene gelöste Proteine mit in die Messung eingehen und eine verstärkte Extinktion bewirken.

Der spektralphotometrische Vergleich zwischen Proben aus reinem Serum und Proben aus hämolytischem Serum läßt bei den nicht-zentrifugierten Proben die durch zusätzliche gelöste Proteine bedingte verstärkte Extinktion in höher liegenden Kurvengipfeln graphisch deutlich werden.

Die Hämolyse bewirkt aber keine seitliche Verschiebung der Kurvengipfel, was einer Änderung des Extinktionsmaximums bezüglich der bei der Messung verwendeten Wellenlänge entsprechen würde. Die von BESSEY, LOWRY und BROCK empfohlene Messung bei einer Wellenlänge von 415 nm zur Ausschaltung eines Hämolyseeinflusses erscheint aus den spektralphotometrischen Ergebnissen dieses Versuchs nicht angebracht, da die erhaltenen Kurvengipfel als graphische Darstellung des Extinktionsmaximums auch bei hämolytischem Serum bei etwa 400-405 nm liegen. Die Empfehlung, die Extinktionsmessungen bei einer Wellenlänge von 415 nm vorzunehmen, scheint ganz spezifisch für die von den Autoren verwendete Versuchstechnik zu gelten. Sie unterscheidet sich von der in dieser Arbeit verwendeten Methode zunächst darin, daß die Enzymreak-

tion nicht mit Trichloressigsäure unterbrochen wird und die ausgefällten Serumproteine daher anschließend nicht abzentrifugiert werden. Ein weiterer Unterschied besteht darin, daß der Leerwert durch pH-Änderung in der Probe (Zugabe von HCl) gebildet wird.

Auf Grund der beschriebenen eigenen Ergebnisse soll deshalb in zukünftigen Versuchen die Extinktionsmessung bei 405 nm im Eppendorf-Photometer beibehalten werden.

Aus dem vorausgehenden Versuch und seinen Interpretationen lassen sich einige wesentliche Folgerungen ableiten:

Da ein Einfluß gelöster Serumproteine wahrscheinlich gemacht werden konnte, der bei Verwendung von hämolytischem Serum besonders deutlich wird, sollte auf das Zentrifugieren nicht verzichtet werden. Diese Forderung gewinnt besondere Bedeutung im Hinblick darauf, daß in späteren Versuchen auch Blutflecken untersucht werden sollen, bei denen naturgemäß immer eine ausgeprägte Hämolyse vorliegt.

Daß trotz dieser für Versuche der vorliegenden Arbeit erhobenen Forderung in dem handelsüblichen BOEHRINGER-Test auf das Zentrifugieren verzichtet wird, hängt sicherlich mit der anderen Verwendung des Tests zusammen. Bei dem Phosphatase-nachweis der Firma BOEHRINGER wird ausdrücklich die Verwendung reinen Serums gefordert, eine erweiterte Anwendung auf hämolytisches Serum oder Blutflecken ist demnach nicht vorgesehen, weil solche Untersuchungen wohl außerhalb des Anwendungsbereiches eines klinischen Labors liegen. Wenn der Einfluß von gelösten Serumproteinen auf die Meßwerte im BOEHRINGER-Test in Kauf genommen wird, so kann von der Überlegung ausgegangen werden, daß in allen nichthämolytischen Seren der enthaltene Proteinanteil weitgehend gleich groß ist; so daß sein für die Extinktionsmessung wirksamer Einfluß als konstanter Faktor vernachlässigt werden kann.

Unter diesem Gesichtspunkt kann auch die in Kapitel A,1 S. 7 verwendete modifizierte Methode zur Untersuchung der alkalischen Phosphatase aus hämolysefreien Seren im Verlauf verschiedener Schwangerschaftswochen - bei der ebenfalls auf das Zentrifugieren verzichtet wurde - als exakt und brauchbar angesehen werden.

## D Versuche mit getrockneten Blutflecken

### 1. Allgemeine Betrachtungen

OYA, ASANO und FUWA verwendeten 2 cm<sup>2</sup> große Blutflecken, die auf Filterpapier (TOYO Nr.1) getrocknet worden waren. Aus Gründen größerer Praxisbezogenheit wurden in dieser Arbeit Leinenlappchen verwendet. Eine adäquate Fleckengröße sollte u.a. in dem Vorversuch herausgefunden werden. Dazu wurden die Blutflecken in der Größe von 0,5 cm<sup>2</sup> bis 3 cm<sup>2</sup> variiert, wobei die 2 und 3 cm<sup>2</sup> großen Blutflecken nicht aus einem einzigen Flecken der jeweiligen Größe bestanden, sondern aus der entsprechenden Anzahl 1 cm<sup>2</sup> großer Flecken. Diese Maßnahme war deshalb erforderlich, weil den Flecken 0,5 ml Pufferlösung zugegeben wurde und ein einzelner großer Flecken im Reagenzglas möglicherweise nicht vollständig von Pufferflüssigkeit bedeckt worden wäre. Aus demselben Grunde war die höchstmögliche verwendbare Fleckengröße auf insgesamt 3 cm<sup>2</sup> begrenzt.

Bei Herstellung der Blutflecken fiel auf, daß das aus einem großen Flecken bestehende Ausgangsmaterial unterschiedlich durchtränkt war, was äußerlich durch verschieden starke Färbung erkennbar war: während an der Auftropfstelle in der Mitte des Fleckens dunkle kräftige Farbtöne vorlagen, war die Peripherie des Fleckens meist deutlich blasser; wurden die Flecken in anderen Fällen zum Trocknen aufgehängt, so waren sie am unteren Rand dunkel, am oberen Rand klarer gefärbt. Der im ersten Experiment mit getrockneten Blutflecken angestellte Versuch, die angegebene Fleckengröße mit Hilfe von Millimeterpapier exakt herzustellen, erscheint angesichts der unterschiedlichen Durchtränkung der Einzelflecken wenig sinnvoll. Es wurde deshalb in späteren Experimenten darauf verzichtet, die Fleckengröße mit übertriebener Sorgfalt exakt einzuhalten. Statt dessen wurde von Anfang an und in allen weiteren Versuchen darauf geachtet, daß nicht extrem unterschiedlich durchtränkte Flecken in zu vergleichende Pro-

ben oder einseitig in Probe oder zugehörigem Leerwert verwendet wurden.

## 2. Ein Vorversuch

Beim Nachvollziehen der Methode von OYA, ASANO und FUWA an getrockneten Blutflecken stellte sich heraus, daß bei Unterbrechung der Enzymreaktion mit 1 ml 10%iger Trichloressigsäure durch zur Zeit nicht erklärbares chemische Interaktionen eine geringfügige Blasenbildung auftrat, die zu einer geringgradig schaumigen Verklumpung von Hämolysestoffen an der Oberfläche des Versuchsansatzes führte. Durch das anschließende Zentrifugieren über 5 min bei 3000 Upm wurde der Hauptteil der verklumpten, bei Hämolyse frei werdenden Substanzen niedergeschlagen, es blieben jedoch immer geringe Mengen kleinster Partikelchen als Schwebestoffe in dem sonst weitgehend klaren Überstand. Es ließ sich nicht vermeiden, daß diese Schwebepartikel beim Abpipettieren des für die Untersuchung erforderlichen 1 ml Überstandes mit in die Pipette gelangten. Beim Zugeben von 4 ml 0,2 N NaOH gingen diese Schwebestoffe aber wieder in Lösung, so daß eine optisch klare Flüssigkeit entstand, die der photometrischen Messung zugeführt wurde.

Zum Vergleich wurden neben der Untersuchung von Blutflecken auch jeweils 0,1 ml Serum des jeweiligen Blutes verarbeitet, um vergleichende Betrachtungen anstellen zu können.

Neben Blutflecken aus Schwangerenblut wurden auch Blutflecken untersucht, die aus dem Blut eines männlichen Probanden hergestellt waren. Es sollte damit die Hypothese überprüft werden, daß in Blutflecken männlicher Probanden keine hitzestabile alkalische Phosphatase vorhanden ist, da sie ein spezifisches Merkmal des Schwangerenblutes darstellt. Wenn diese Hypothese im Versuch bestätigt werden sollte, so ergäbe sich neben dem Chemikalienblindwert und dem echten Leerwert eine neue Möglichkeit der Leerwertbildung, indem statt eines Leerwertes aus demselben zu untersuchenden Flecken aus Schwangerenblut ein Fleck aus männlichem Probanden-

blut herangezogen wird, der dann nicht wie ein echter Leerwert, sondern wie eine Blutfleckenprobe angesetzt und verarbeitet wird (vgl. Kapitel B,3, S. 15). Ein auf diese Art und Weise eventuell herstellbarer Ersatz für die bisher verwendeten echten Leerwerte, kann in der forensischen Praxis dann von Bedeutung sein, wenn der zur Untersuchung gelangende Blutfleck zu klein ist und so die zusätzliche Herstellung eines echten Leerwertes nicht mehr gestattet. Aus diesen Erwägungen wurde bei den Ergebnissen eine Meß-Kombination von Blutfleck aus Schwangerenblut gegen entsprechend großen Blutfleck aus männlichem Blut mit berücksichtigt.

Die Ergebnisse dieses ersten Versuches mit getrockneten Blutflecken sind in der folgenden Tab. 6 wiedergegeben.

#### Tab. 6

#### Vorversuch zur Blutfleckenuntersuchung

#### Technische Daten

Alter der Blutproben: Schwangerenserum und -blutfleck  
Nr.2/75: 36 h  
Serum + Blutfleck "männlich": 48 h (vom 7.8.75, wurde nur in diesem Versuch verwendet)  
Serummenge: 0,1 ml hämolysefreies Serum  
Blutfleckengröße: 0,5 - 3 cm<sup>2</sup>  
Puffer: 0,5 ml Glycin-Puffer / Carbonat-Puffer  
Eliminierung der hitzelabilen Phosphatase: 40 min bei 60°C im Warmluftschrank  
Substratkonzentration: 0,5 ml Dinatrium-p-Nitrophenylphosphat (0,4430g / 100 ml)  
Enzymreaktion: 1 h bei 37°C im Warmluftschrank  
Unterbrechung der Enzymreaktion mit 1 ml 10%iger Trichlor-essigsäure  
Zentrifugieren: 5 min bei 3000 Upm  
Alkalisieren: 1 ml klarer Überstand + 4 ml 0,2 N NaOH  
Leerwert: echter Leerwert (e.L.), Chemikalienblindwert (Ch.Bl.), Messung der Schwangerenserum bzw. -blut-flecken gegen Proben des männlichen Probanden (Pr.Schw./Pr.männl.)  
Extinktionsmessung: bei 405 nm im Eppendorf-Photometer

Glycin-Puffer, Schwangerschaft

|                             | Pr./e.L. | Pr./Ch.Bl. | e.L./Ch.Bl. | Pr.Schw./<br>Pr.männl. |
|-----------------------------|----------|------------|-------------|------------------------|
| hämolysfreieies             |          |            |             |                        |
| Serum Nr.2/75               | 0,261    | 0,287      | -0,017      | 0,276                  |
| Blutfleck 3 cm <sup>2</sup> | 0,215    | 0,169      | -0,046      | 0,132                  |
| Blutfleck 2 cm <sup>2</sup> | 0,042    | 0,126      | 0,074       | 0,091                  |
| Blutfleck 1 cm <sup>2</sup> | -0,008   | 0,034      | 0,056       | 0,012                  |
| Blutfleck 0,5"              | -0,009   | 0,029      | 0,042       | 0,004                  |

Glycin-Puffer, Männlich

|                             |        |       |       |
|-----------------------------|--------|-------|-------|
| hämolysfreieies             |        |       |       |
| Serum                       | -0,006 | 0,026 | 0,019 |
| Blutfleck 3 cm <sup>2</sup> | 0,005  | 0,042 | 0,030 |
| Blutfleck 2 cm <sup>2</sup> | -0,003 | 0,033 | 0,032 |
| Blutfleck 1 cm <sup>2</sup> | 0,000  | 0,025 | 0,021 |
| Blutfleck 0,5"              | -0,004 | 0,022 | 0,025 |

Carbonat-Puffer, Schwangerschaft

|                             |       |       |       |       |
|-----------------------------|-------|-------|-------|-------|
| hämolyssefreies             |       |       |       |       |
| Serum Nr.2/75               | 0,670 | 0,692 | 0,012 | 0,680 |
| Blutfleck 3 cm <sup>2</sup> | 0,084 | 0,108 | 0,024 | 0,049 |
| Blutfleck 2 cm <sup>2</sup> | 0,146 | 0,165 | 0,022 | 0,109 |
| Blutfleck 1 cm <sup>2</sup> | 0,046 | 0,065 | 0,025 | 0,037 |
| Blutfleck 0,5"              | 0,135 | 0,176 | 0,020 | 0,153 |

Carbonat-Puffer, Männlich

|                             |       |       |       |
|-----------------------------|-------|-------|-------|
| hämolysfreieies             |       |       |       |
| Serum                       | 0,004 | 0,013 | 0,013 |
| Blutfleck 3 cm <sup>2</sup> | 0,044 | 0,064 | 0,032 |
| Blutfleck 2 cm <sup>2</sup> | 0,013 | 0,049 | 0,032 |
| Blutfleck 1 cm <sup>2</sup> | 0,008 | 0,029 | 0,023 |
| Blutfleck 0,5"              | 0,004 | 0,022 | 0,015 |

### Ergebnisinterpretation:

Bei der verwendeten Methode zur Untersuchung der hitzestabilen alkalischen Phosphatase aus Blutflecken wird deutlich, daß im Serum und in Blutflecken des männlichen Probanden keine hitzestabile alkalische Phosphatase nachweisbar ist: Messungen der Proben gegen den echten Leerwert liegen nahe Null, Messungen der Proben gegen den Chemikalienblindwert liegen etwa in gleicher Größenordnung wie Messungen der echten Leerwerte aus Schwangerenblutflecken gegen den Chemikalienblindwert. Es läßt sich daraus vorläufig folgern, daß echte Leerwerte aus Schwangerenblutflecken durch Blutfleckenproben aus männlichem Probandenblut ersetzt werden können und daß bei Messung der Schwangerenproben gegen Proben des männlichen Probanden ebenfalls sinnvolle Ergebnisse resultieren, was aus dem Vergleich der entsprechenden Meßreihen hervorgeht.

Bei Betrachtung der den jeweiligen Fleckengrößen aus Schwangerenblut entsprechenden Extinktionswerten läßt sich in etwa ermessen, daß offenbar Fleckengrößen von über  $1 \text{ cm}^2$  erforderlich sind, um deutlich von Null unterscheidbare Ergebnisse zu erhalten.

Ferner ergibt sich eine - allerdings nicht konsequente - Proportionalität zwischen Fleckengröße und entsprechendem Extinktionswert. Dieses Phänomen kann möglicherweise durch 2 Gegebenheiten verursacht sein: Einmal gehen in die Versuchsanordnung unvermeidliche Durchtränkungsunterschiede der Blutläppchen ein, zum anderen bestehen Verunreinigungen des Versuchsansatzes in Form der oben beschriebenen Hämolyse-Schwebestoffe. Diese "Hämolyseteilchen" haben Proteinnatur und gehen bei Zugabe von NaOH wieder in Lösung. Wie aber im Kapitel C S.32ff. dargelegt wurde, sind gelöste Proteine in der Lage, Versuchsergebnisse zu verfälschen. Von diesen zur Zeit unkontrollierbaren Versuchsbedingungen unabhängig sind lediglich die Meßergebnisse der Serumversuche. An ihnen läßt sich auch in diesem Versuch die Überlegenheit des Carbonat-Puffers zeigen.

Im Hinblick auf zukünftige Versuche läßt sich über die Ergebnisse dieser ersten Blutfleckenuntersuchung sagen, daß die Methode vom Ansatz her zu funktionieren scheint, daß aber unterschiedliche Blutfleckendurchtränkung und durch Hämolyse verursachte Schwebestoffe die Ergebnisse noch nachteilig beeinflussen.

Das Problem unterschiedlicher Blutfleckendurchtränkung wirft die Frage nach der Dosierbarkeit der in den Versuchsansatz eingehenden Blutmenge auf. Bei OYA, ASANO und FUWA ist dieses Problem möglicherweise dadurch stark eingegrenzt, daß die Autoren Filterpapier einer ganz bestimmten standardisierten Sorte verwendeten. Aus Gründen größerer Praxisbezogenheit wurden in dieser Arbeit aber Leinenlappchen verwendet, bei denen nicht mit einer konstanten Saugfähigkeit gerechnet werden kann, sondern bei denen vielleicht der Modus des Blutauftröpfens und des Trocknens zu unterschiedlicher Durchtränkung führen können. Da in der forensischen Praxis mit noch größeren Varianten der Stoffqualität zu rechnen ist und dann eine exakte Dosierbarkeit der in den Versuchsansatz eingehenden Blutmenge noch schwieriger wird, sollte auch in zukünftigen Versuchen der vorliegenden Arbeit dieser die Meßergebnisse eventuell beeinflussende Punkt nicht überbewertet werden; es wurde lediglich darauf geachtet, daß Flecken mit optisch erkennbar stark unterschiedlicher Tönung nicht in miteinander zu vergleichenden Proben verwendet wurden.

Mehr Sorgfalt sollte darauf verwendet werden, den in die Meßergebnisse eingehenden Einfluß der durch Hämolyse bedingten Schwebestoffe zu reduzieren. Diese Absicht sollte dadurch verwirklicht werden, daß im folgenden Versuch auf das Zentrifugieren verzichtet und statt dessen filtriert wurde.

### 3. Versuch einer methodischen Verbesserung

Wegen der im Vorversuch der Blutfleckenexperimente gewonnenen Erfahrung sollte im weiteren Verlauf der Untersuchungen der Arbeitsgang des Zentrifugierens in der bisherigen Ver-

suchsanordnung durch Filtrieren ersetzt werden. Es wurde dazu rundes Faltenfilterpapier der Firma SCHLEICHER und SCHÜLL, Artikel-Nr. Selecta 595 1/2 mit 5,5 cm Durchmesser verwendet. Das halb geöffnete Filterpapiertütchen wurde einfach in die Reagenzglasöffnung gesteckt. Schon sehr bald stellte sich aber heraus, daß die z.T. eng aneinanderliegenden Falten des Filters wie Kapillaren wirkten, in denen Schwebestoffe in die Höhe stiegen und zumindest die Gefahr bestand, daß sie den durchfeuchteten Filterpapierrand überschreiten könnten.

Ferner zeigte sich, daß durch die Verwendung des Filterpapiers ein Teil der Flüssigkeit im Filterpapier verblieb, so daß in einigen Fällen nach Augenschein nur knapp der zur Weiterverarbeitung erforderliche 1 ml klaren Filtrates zur Verfügung stand. Auf ein Auspressen des Filterpapiers wurde verzichtet, um Vereunreinigungen zu vermeiden. Es wurde statt dessen nur 0,5 ml der klaren Lösung abgezogen und zur Weiterverarbeitung mit 2 ml 0,2' N NaOH versetzt. Dieses Vorgehen führte zu gleichen Mischungsverhältnissen wie bei der früheren Arbeitsweise (1 ml Überstand + 4 ml 0,2 N NaOH); die um die Hälfte geringere Endmenge genügte aber, um die Küvetten für die photometrische Messung noch ausreichend zu füllen.

Die Ergebnisse dieses Versuches sind in der folgenden Tab. 7 wiedergegeben:

#### Tab. 7

Blutfleckenuntersuchung mit methodischer Verbesserung  
(Filterpapier frei über Reagenzglas)

#### Technische Daten:

##### Alter der Blutproben:

- Schwangerenserum und -blutfleck Nr. 4/75: 12 h
- Schwangerenserum und -blutfleck Nr. 3/75: 1 Tag
- Schwangerenserum und -blutfleck Nr. 2/75: 6 Tage
- Serum und Blutfleck "männlich 75": 1 Tag

Serummenge: 0,1 ml hämolysefreies Serum

Blutfleckengröße: 1 - 3 cm<sup>2</sup>

Puffer: 0,5 ml Glycin-Puffer / Carbonat-Puffer

Eliminierung der hitzelabilen Phosphatase: 40 min bei 60°C  
im Warmluftschrank

Substratkonzentration: 0,5 ml Dinatrium-p-Nitrophenylphosphat (0,4430 g / 100 ml)

Enzymreaktion: 1 h bei 37°C im Warmluftschrank  
Unterbrechung der Enzymreaktion mit 1 ml 10%iger Trichlor-  
essigsäure

Filtern mit Filterpapier frei über Reagenzglas

Alkalisieren: 0,5 ml klares Filtrat + 2 ml 0,2 N NaOH

Leerwert: echter Leerwert (e.L.), Chemikalienblindwert  
(Ch.Bl.), Messung der Schwangerenserum bzw. -blutflek-  
ken gegen Proben des männlichen Probanden  
(Pr.Schw./Pr.männl.75)

Extinktionsmessung: bei 405 nm im Eppendorf-Photometer

# Glycin-Puffer

| Serum, Fleck 4/75 | Pr./e.L. | Pr./Ch.Bl. | e.L./Ch.Bl. | Pr.Schw./<br>Pr.männl.75 |
|-------------------|----------|------------|-------------|--------------------------|
|-------------------|----------|------------|-------------|--------------------------|

hämolysefreies

|                         |       |       |       |           |
|-------------------------|-------|-------|-------|-----------|
| Schwangerenserum        | 0,390 | 0,410 | 0,026 | 0,382     |
| Fleck 3 cm <sup>2</sup> | 0,110 | 0,135 | 0,031 | 0,029 (*) |
| Fleck 2 cm <sup>2</sup> | 0,038 | 0,072 | 0,034 | 0,032     |
| Fleck 1 cm <sup>2</sup> | 0,014 | 0,045 | 0,034 | 0,025     |

# Serum, Fleck 3/75

hämolysefreies

|                         |          |          |       |           |
|-------------------------|----------|----------|-------|-----------|
| Schwangerenserum        | 0,064    | 0,079    | 0,017 | 0,079     |
| Fleck 3 cm <sup>2</sup> | 0,313(!) | 0,316(!) | 0,033 | 0,210 (*) |
| Fleck 2 cm <sup>2</sup> | 0,044    | 0,070    | 0,030 | 0,035     |
| Fleck 1 cm <sup>2</sup> | 0,035    | 0,069    | 0,023 | 0,043     |

# Serum, Fleck 2/75

hämolysefreies

|                         |       |       |       |           |
|-------------------------|-------|-------|-------|-----------|
| Schwangerenserum        | 0,302 | 0,305 | 0,017 | 0,274     |
| Fleck 3 cm <sup>2</sup> | 0,138 | 0,180 | 0,043 | 0,080 (*) |
| Fleck 2 cm <sup>2</sup> | 0,111 | 0,132 | 0,027 | 0,093     |
| Fleck 1 cm <sup>2</sup> | 0,038 | 0,052 | 0,017 | 0,032     |

# Serum, Fleck "männlich 75"

hämolysefreies

|                         |          |          |       |  |
|-------------------------|----------|----------|-------|--|
| Serum                   | 0,019    | 0,022    | 0,009 |  |
| Fleck 3 cm <sup>2</sup> | 0,080(!) | 0,106(!) | 0,033 |  |
| Fleck 2 cm <sup>2</sup> | 0,007    | 0,034    | 0,031 |  |
| Fleck 1 cm <sup>2</sup> | 0,002    | 0,022    | 0,019 |  |

(!) Durch Schwebestoffe verfälschte Meßwerte.

(\*) Werte, bei denen mittelbar ein mit (!) gekennzeichneteter  
Wert mit eingegangen ist.

Tab. 7 (Fortsetzung)

Carbonat-Puffer

| Serum, Fleck 4/75 | Pr./e.L. | Pr./Ch.Bl. | e.L./<br>Ch.Bl. | Pr.Schw./<br>Pr.männl.75 |
|-------------------|----------|------------|-----------------|--------------------------|
|-------------------|----------|------------|-----------------|--------------------------|

---

|                         |       |       |       |           |
|-------------------------|-------|-------|-------|-----------|
| hämolysereies           |       |       |       |           |
| Schwangerenserum        | 0,530 | 0,548 | 0,016 | 0,519     |
| Fleck 3 cm <sup>2</sup> | 0,106 | 0,146 | 0,040 | 0,106     |
| Fleck 2 cm <sup>2</sup> | 0,102 | 0,143 | 0,041 | 0,100     |
| Fleck 1 cm <sup>2</sup> | 0,043 | 0,071 | 0,034 | 0,013 (*) |

Serum, Fleck 3/75

|                         |       |       |       |           |
|-------------------------|-------|-------|-------|-----------|
| hämolysereies           |       |       |       |           |
| Schwangerenserum        | 0,291 | 0,314 | 0,025 | 0,300     |
| Fleck 3 cm <sup>2</sup> | 0,131 | 0,151 | 0,022 | 0,112     |
| Fleck 2 cm <sup>2</sup> | 0,065 | 0,090 | 0,031 | 0,058     |
| Fleck 1 cm <sup>2</sup> | 0,082 | 0,098 | 0,021 | 0,012 (*) |

Serum, Fleck 2/75

|                         |       |       |       |           |
|-------------------------|-------|-------|-------|-----------|
| hämolysereies           |       |       |       |           |
| Schwangerenserum        | 0,571 | 0,590 | 0,020 | 0,552     |
| Fleck 3 cm <sup>2</sup> | 0,161 | 0,185 | 0,021 | 0,144     |
| Fleck 2 cm <sup>2</sup> | 0,078 | 0,113 | 0,035 | 0,077     |
| Fleck 1 cm <sup>2</sup> | 0,036 | 0,060 | 0,024 | 0,022 (*) |

Serum, Fleck  
"männlich 75"

|                         |          |          |       |  |
|-------------------------|----------|----------|-------|--|
| hämolysereies           |          |          |       |  |
| Serum                   | 0,007    | 0,024    | 0,019 |  |
| Fleck 3 cm <sup>2</sup> | -0,015   | 0,038    | 0,059 |  |
| Fleck 2 cm <sup>2</sup> | 0,015    | 0,035    | 0,024 |  |
| Fleck 1 cm <sup>2</sup> | 0,078(!) | 0,084(!) | 0,023 |  |

Ergebnisinterpretation:

Einige mit Ausrufungszeichen gekennzeichnete Meßwerte fallen völlig aus dem Rahmen, was durch im Filtrat makroskopisch sichtbare und die Messung verfälschende Hämolysprodukte erklärt werden kann. Die mit Stern gekennzeichneten Werte sind mittelbare Fehlerwerte, die dadurch entstanden sind, daß bei der Messung ein mit Ausrufungszeichen versehe-

ner Wert mittelbar beteiligt war. Trotz einiger Fehlerwerte erscheint die Methodik durch Einführen des Filtrierens inso- weit verbessert zu sein, daß die Meßwerte dieses Versuches deutlichere Interpretationen zulassen als die des Vorversu- ches.

Zunächst läßt sich für beide Puffer eine Proportionalität zwischen Fleckengröße und Meßwert feststellen. Ferner wird deutlich, daß aus 3 cm<sup>2</sup>-großen Blutflecken der verwendeten Stoffqualität weniger hitzestabile alkalische Phosphatase nachweisbar ist als aus 0,1 ml reinem Serum. Eine Vergröße- rung der Flecken kam aber aus der in Kapitel D,1 S. 37 gegebenen Begründung nicht in Betracht.

Wie schon aus dem Vorversuch ersichtlich, liefern Proben von Schwangerenblutflecken gemessen gegen Blutfleckenproben aus männlichem Blut als ersatzweisem Leerwert ebenfalls sinn- volle Ergebnisse.

Beim Vergleich der beiden verwendeten Puffer ergibt sich in diesem Versuch nicht nur bei den Serumuntersuchungen eine Überlegenheit des Carbonat-Puffers, sondern er zeigte sich auch bei der Blutfleckenuntersuchung. Hier ist die bessere Eignung des Carbonat-Puffers besonders bei kleinen Blutflek- ken von Bedeutung, bei denen geringe Mengen vorhandener hit- zestabiler alkalischer Phosphatase eventuell noch sicherer nachgewiesen werden können.

In dieser Versuchsinterpretation soll einmal besonders auf die Meßreihe "echter Leerwert gegen Chemikalienblindwert" hingewiesen werden: Da im echten Leerwert keine Enzymreaktion abläuft, soll in dem Extinktionswert "echter Leerwert gegen Chemikalienblindwert" lediglich der im echten Leerwert zu- sätzlich vorhandene Serumanteil mit zum Ausdruck kommen (vgl. Kap. B,3, S. 18), der bei Verwendung von Blutflecken durch das Eluieren ebenso wie im reinen Serum wirksam wird und der wegen der unterschiedlichen Durchtränkung der Blutflecken wahrscheinlich einer größeren Streuung unterliegt als bei den exakt pipettierbaren Serumversuchen. Natürlich schlagen sich im echten Leerwert auch Filtrierfehler nieder, wenn in das klare Filtrat des echten Leerwertes Schwebestoffe übergetre-

ten sind und nach Zugabe der NaOH als wieder in Lösung gegangene Serumproteine die Meßwerte im Sinne einer Meßwerterhöhung verfälschen (vgl. Kap. C, S. 32). Es läßt sich also an der Höhe und der Streuung der Extinktionswerte "echter Leerwert gegen Chemikalienblindwert" die Exaktheit der Methodik in gewisser Weise ablesen. In diesem Zusammenhang erscheint es erwähnenswert, daß die Extinktionswerte der Serumversuche, bei denen größtmögliche Exaktheit möglich ist, am geringsten ausfallen. Ferner wird deutlich, daß ein gewisser Serumeinfluß auch durch das Filtrieren nicht ausschaltbar zu sein scheint, da auch bei diesen Messungen der echten Leerwerte gegen den Chemikalienblindwert eine, wenn auch nicht immer konsequente, Proportionalität zwischen Fleckengröße und Extinktionswert besteht (Ursache in gelösten Serumsalzen, die den Filter passieren?, vgl. Kap. B.3, S. 18).

Als weitere Verbesserung sollte im folgenden Versuch nicht mehr einfach das Filterpapiertütchen in das Reagenzglas gesteckt werden, sondern ein Trichter verwendet werden. Damit keine als Kapillaren wirksamen, eng aneinanderliegenden Filterpapierfalten mehr auftreten konnten, wurden die Filterpapiere vor Gebrauch zunächst ganz entfaltet und glattgestrichen: beim Einlegen des Filterpapiers in den Trichter falteten sich die Filter ganz spontan wieder gemäß der vorgegebenen Trichterform. Vor dem Eingießen der zu filtrierenden Flüssigkeit wurde noch einmal kontrolliert, ob keine eng aneinanderliegenden Falten des Filterpapiers vorlagen.

Beim Eingießen der zu filtrierenden Lösung selbst wurden nicht mehr die gesamten 2 ml auf einmal in den mit Filterpapier bestückten Trichter geschüttet, was dessen Größe ohne weiteres erlaubt hätte. Statt dessen wurde es vorgezogen, mehr gleichmäßig tropfend einzufüllen, um ein Emporsteigen von vorhandenen Schwebestoffen am durchfeuchteten Filterpapierrand nach Möglichkeit zu verhindern.

In diesem Versuch sollte noch einmal versucht werden, aus den 2 ml Ausgangslösung 1 ml klare Lösung zur Weiterverarbeitung zu gewinnen, was jedoch in einigen Fällen nur knapp nicht gelang. Konnte 1 ml klare Lösung nicht blasenfrei in

die Pipette gezogen werden - wobei ein höherer Pipettenstand wegen des Fingerumsetzens auf die Pipettenöffnung erforderlich war - so wurde die gesamte Probe, die dann etwas mehr als 1 ml klare Lösung erhielt, zur Weiterverarbeitung benutzt. Die Werte sind in den Versuchsergebnissen mit (!) gekennzeichnet und ergaben auf Grund minimal größerer Ausgangsmengen auch höhere Extinktionswerte.

Die Ergebnisse des Versuchs sind in der folgenden Tab. 8 wiedergegeben.

Tab. 8

Blutfleckenuntersuchung mit methodischer Verbesserung  
(Filterpapier im Trichter)

Technische Daten:

Alter der Blutproben:

Schwangerenserum und -blutfleck Nr. 3/75: 5 Tage

Schwangerenserum und -blutfleck Nr. 4/75: 4 Tage

Schwangerenserum und -blutfleck Nr. 5/75: 3 Tage

Schwangerenserum und -blutfleck Nr. 6/75: 3 Tage

Serum und Blutfleck "männlich 75": 5 Tage

Serummenge: 0,1 ml hämolysefreies Serum

Blutfleckengröße: 1 - 3 cm<sup>2</sup>

Puffer: 0,5 ml Glycin-Puffer / Carbonat-Puffer

Eliminierung der hitzelabilen Phosphatase: 40 min bei 60°C  
im Warmluftschrank

Substratkonzentration: 0,5 ml Dinatrium-p-Nitrophenylphosphat (0,4430 g / 100 ml)

Enzymreaktion: 1 h bei 37°C im Warmluftschrank

Unterbrechung der Enzymreaktion mit 1 ml 10%iger Trichlor-essigsäure

Filtern mit Filterpapier im Trichter

Alkalisieren: 1 ml klares Filtrat + 4 ml 0,2 N NaOH

Leerwert: echter Leerwert (e.L.), Chemikalienblindwert

(Ch.Bl.), Messung der Schwangerenserum bzw. -blutflecken gegen Proben des männlichen Probanden

(Pr.Schw./Pr.männl.75)

Extinktionsmessung bei 405 nm im Eppendorf-Photometer

Tab. 8

Glycin-Puffer

| Serum, Fleck 3/75 | Pr./e.L. | Pr./Ch.Bl. | e.L./<br>Ch.Bl. | Pr.Schw./<br>Pr.männl.75 |
|-------------------|----------|------------|-----------------|--------------------------|
|-------------------|----------|------------|-----------------|--------------------------|

|                                    |       |       |       |       |
|------------------------------------|-------|-------|-------|-------|
| hämolysefreies<br>Schwangerenserum | -     | 0,175 | -     | 0,148 |
| Fleck 3 cm <sup>2</sup>            | 0,020 | 0,056 | 0,043 | 0,021 |
| Fleck 2 cm <sup>2</sup>            | 0,032 | 0,065 | 0,031 | 0,030 |
| Fleck 1 cm <sup>2</sup>            | 0,018 | 0,047 | 0,028 | 0,015 |

Serum, Fleck 4/75

|                                    |       |       |          |       |
|------------------------------------|-------|-------|----------|-------|
| hämolysefreies<br>Schwangerenserum | 0,322 | 0,339 | 0,019    | 0,305 |
| Fleck 3 cm <sup>2</sup>            | 0,031 | 0,079 | 0,042(!) | 0,044 |
| Fleck 2 cm <sup>2</sup>            | 0,046 | 0,097 | 0,037    | 0,058 |
| Fleck 1 cm <sup>2</sup>            | -     | -     | -        | -     |

Serum, Fleck 5/75

|                                    |       |       |       |       |
|------------------------------------|-------|-------|-------|-------|
| hämolysefreies<br>Schwangerenserum | 0,306 | 0,323 | 0,021 | 0,295 |
| Fleck 3 cm <sup>2</sup>            | 0,076 | 0,106 | 0,030 | 0,070 |
| Fleck 2 cm <sup>2</sup>            | 0,032 | 0,062 | 0,028 | 0,027 |
| Fleck 1 cm <sup>2</sup>            | 0,028 | 0,057 | 0,028 | 0,024 |

Serum, Fleck 6/75

|                                    |       |       |       |       |
|------------------------------------|-------|-------|-------|-------|
| hämolysefreies<br>Schwangerenserum | 0,329 | 0,353 | 0,021 | 0,323 |
| Fleck 3 cm <sup>2</sup>            | 0,074 | 0,121 | 0,043 | 0,083 |
| Fleck 2 cm <sup>2</sup>            | 0,105 | 0,146 | 0,043 | 0,107 |
| Fleck 1 cm <sup>2</sup>            | 0,037 | 0,068 | 0,032 | 0,035 |

Serum, Fleck  
"männlich 75"

|                         |       |       |       |
|-------------------------|-------|-------|-------|
| hämolysefreies<br>Serum | 0,005 | 0,027 | 0,023 |
| Fleck 3 cm <sup>2</sup> | 0,012 | 0,039 | 0,028 |
| Fleck 2 cm <sup>2</sup> | 0,000 | 0,034 | 0,031 |
| Fleck 1 cm <sup>2</sup> | 0,000 | 0,034 | 0,033 |

(!) Erhöhte Extinktionswerte durch größere Eingangsmenge.  
- Keine Werte erhältlich wegen Serum- oder Fleckenmangel.

Tab. 8 (Fortsetzung)

Carbonat-Puffer

| Serum, Fleck 3/75 | Pr./e.L. | Pr./Ch.Bl. | e.L./<br>Ch.Bl. | Pr.Schw./<br>Pr.männl.75 |
|-------------------|----------|------------|-----------------|--------------------------|
|-------------------|----------|------------|-----------------|--------------------------|

hämolyssefreies

|                         |       |       |       |       |
|-------------------------|-------|-------|-------|-------|
| Schwangerenserum        | -     | -     | -     | -     |
| Fleck 3 cm <sup>2</sup> | 0,026 | 0,045 | 0,019 | 0,026 |
| Fleck 2 cm <sup>2</sup> | 0,036 | 0,055 | 0,020 | 0,032 |
| Fleck 1 cm <sup>2</sup> | 0,024 | 0,046 | 0,020 | 0,015 |

Serum, Fleck 4/75

hämolyssefreies

|                         |       |       |       |       |
|-------------------------|-------|-------|-------|-------|
| Schwangerenserum        | 0,475 | 0,495 | 0,021 | 0,468 |
| Fleck 3 cm <sup>2</sup> | 0,102 | 0,117 | 0,019 | 0,088 |
| Fleck 2 cm <sup>2</sup> | 0,089 | 0,110 | 0,024 | 0,086 |
| Fleck 1 cm <sup>2</sup> | -     | -     | -     | -     |

Serum. Fleck 5/75

hämolyssefreies

|                         |       |       |       |       |
|-------------------------|-------|-------|-------|-------|
| Schwangerenserum        | 0,611 | 0,632 | 0,024 | 0,600 |
| Fleck 3 cm <sup>2</sup> | 0,099 | 0,118 | 0,024 | 0,092 |
| Fleck 2 cm <sup>2</sup> | 0,120 | 0,142 | 0,024 | 0,115 |
| Fleck 1 cm <sup>2</sup> | 0,091 | 0,115 | 0,024 | 0,082 |

Serum. Fleck 6/75

hämolyssefreies

|                         |          |          |          |       |
|-------------------------|----------|----------|----------|-------|
| Schwangerenserum        | 0,630    | 0,662    | 0,021    | 0,638 |
| Fleck 3 cm <sup>2</sup> | 0,050    | 0,126    | 0,057(!) | 0,102 |
| Fleck 2 cm <sup>2</sup> | 0,239(!) | 0,223(!) | 0,024    | 0,164 |
| Fleck 1 cm <sup>2</sup> | 0,054    | 0,086    | 0,024    | 0,056 |

Serum, Fleck  
"männlich 75"

hämolyssefreies

|                         |        |       |       |
|-------------------------|--------|-------|-------|
| Serum                   | 0,003  | 0,027 | 0,025 |
| Fleck 3 cm <sup>2</sup> | -0,003 | 0,028 | 0,022 |
| Fleck 2 cm <sup>2</sup> | 0,002  | 0,023 | 0,017 |
| Fleck 1 cm <sup>2</sup> | 0,000  | 0,031 | 0,024 |

### Ergebnisinterpretation:

Die in diesem Versuch angewendete Filtriermethode und Einfülltechnik hat die Methodik insoweit verbessert, als makroskopisch keine Proteinteilchen mehr mit bloßem Auge in dem klaren Filtrat beobachtet wurden.

Wegen des Versuches, unbedingt 1 ml klaren Filtrates zu erhalten, sind die Versuchsergebnisse z.T. beeinträchtigt worden. Wie sich im vorigen Versuch gezeigt hat, reicht eine Menge von 0,5 ml zur Weiterführung des Versuches aus und führt zu einer ausreichenden Küvettenfüllung.

Die im letzten Versuch beschriebene Technik hat die möglichen Fehlerquellen so weit ausgeschaltet, daß sie in dieser Hinsicht als optimal bezeichnet werden kann.

E Versuch mit Hilfe der bisher erarbeiteten Methode,  
Leistungen der Methode, Aussagemöglichkeiten der  
Ergebnisse und Feststellung der Fehlerbreite

Nach Feststellung und Einschränkung der Fehlerquellen soll noch untersucht werden, wie lange die hitzestabile alkalische Phosphatase nachweisbar ist. Ferner soll die Leistung der Methode, die Aussagemöglichkeit der Ergebnisse und vor allem die Fehlerbreite ermittelt werden.

Die Ergebnisse eines Versuchs mit unterschiedlich alten Blutflecken sind in der folgenden Tabelle 9 wiedergegeben.

Tab. 9

Versuch mit Hilfe der bisher erarbeiteten Methode  
mit unterschiedlich alten Blutflecken

Technische Daten:

Alter der Blutproben:

Schwangerenblutfleck Nr. 1/75: 12 Tage

Schwangerenblutfleck Nr. 3/75: 7 Tage

Schwangerenblutfleck Nr. 5/75: 5 Tage

Schwangerenblutfleck Nr. 6/75: 5 Tage

Blutfleck "männlich 75": 7 Tage

Blutfleckengröße: 0,25 - 2 cm<sup>2</sup>

Puffer: 0,5 ml Glycin-Puffer /Carbonat-Puffer

Eliminierung der hitzelabilen Phosphatase: 40 min bei 60°C  
im Warmluftschrank

Substratkonzentration: 0,5 ml Dinatrium-p-Nitrophenylphosphat (0,4430 g / 100 ml)

Enzymreaktion: 1 h bei 37°C im Warmluftschrank

Unterbrechung der Enzymreaktion mit 1 ml 10%iger Trichlor-essigsäure

Filtern mit Filterpapier im Trichter

Alkalisieren: 0,5 ml klares Filtrat + 2 ml 0,2 N NaOH

Leerwert: echter Leerwert (e.L.), Chemikalienblindwert (Ch.Bl.), Messung der Schwangerenblutflecken gegen

Proben des männlichen Probanden (Pr.Schw./Pr.männl.75)

Extinktionsmessung: bei 405 nm im Eppendorf-Photometer

Glycin-Puffer

| Blutfleck 1/75 | Pr./e.L. | Pr./Ch.Bl. | e.L./<br>Ch.Bl. | Pr.Schw./<br>Pr.männl.75 |
|----------------|----------|------------|-----------------|--------------------------|
|----------------|----------|------------|-----------------|--------------------------|

|                      |       |       |       |       |
|----------------------|-------|-------|-------|-------|
| 0,25 cm <sup>2</sup> | 0,038 | 0,053 | 0,021 | 0,028 |
|----------------------|-------|-------|-------|-------|

Blutfleck 3/75

|                      |       |       |       |       |
|----------------------|-------|-------|-------|-------|
| 2 cm <sup>2</sup>    | 0,203 | 0,220 | 0,024 | 0,170 |
| 1 cm <sup>2</sup>    | 0,185 | 0,200 | 0,020 | 0,159 |
| 0,5 cm <sup>2</sup>  | 0,093 | 0,106 | 0,020 | 0,075 |
| 0,25 cm <sup>2</sup> | 0,094 | 0,106 | 0,019 | 0,079 |

Blutfleck 5/75

|                      |       |       |       |       |
|----------------------|-------|-------|-------|-------|
| 1 cm <sup>2</sup>    | 0,395 | 0,422 | 0,034 | 0,369 |
| 0,5 cm <sup>2</sup>  | 0,115 | 0,129 | 0,021 | 0,098 |
| 0,25 cm <sup>2</sup> | 0,025 | 0,040 | 0,020 | 0,024 |

Blutfleck 6/75

|                      |       |       |       |       |
|----------------------|-------|-------|-------|-------|
| 0,5 cm <sup>2</sup>  | 0,269 | 0,285 | 0,025 | 0,245 |
| 0,25 cm <sup>2</sup> | 0,102 | 0,114 | 0,020 | 0,092 |

Blutfleck  
"männlich 75"

|                      |       |       |       |
|----------------------|-------|-------|-------|
| 2 cm <sup>2</sup>    | 0,029 | 0,055 | 0,031 |
| 1 cm <sup>2</sup>    | 0,019 | 0,041 | 0,026 |
| 0,5 cm <sup>2</sup>  | 0,019 | 0,034 | 0,023 |
| 0,25 cm <sup>2</sup> | 0,003 | 0,022 | 0,024 |

Carbonat-Puffer

Blutfleck 1/75

|                      |       |       |       |       |
|----------------------|-------|-------|-------|-------|
| 0,25 cm <sup>2</sup> | 0,097 | 0,116 | 0,019 | 0,093 |
|----------------------|-------|-------|-------|-------|

Blutfleck 3/75

|                      |       |       |       |       |
|----------------------|-------|-------|-------|-------|
| 2 cm <sup>2</sup>    | 0,542 | 0,555 | 0,019 | 0,512 |
| 1 cm <sup>2</sup>    | 0,335 | 0,355 | 0,020 | 0,226 |
| 0,5 cm <sup>2</sup>  | 0,229 | 0,246 | 0,018 | 0,220 |
| 0,25 cm <sup>2</sup> | 0,186 | 0,203 | 0,018 | 0,176 |

Tab. 9 (Fortsetzung)

| Blutfleck 5/75             | Pr./e.L. | Pr.Ch.Bl. | e.L./<br>Ch.Bl. | Pr.Schw./<br>Pr.männl.75 |
|----------------------------|----------|-----------|-----------------|--------------------------|
| 1 cm <sup>2</sup>          | 0,450    | 0,468     | 0,021           | 0,435                    |
| 0,5 cm <sup>2</sup>        | 0,521    | 0,540     | 0,021           | 0,498                    |
| 0,25 cm <sup>2</sup>       | 0,058    | 0,078     | 0,020           | 0,064                    |
| Blutfleck 6/75             |          |           |                 |                          |
| 0,5 cm <sup>2</sup>        | 0,540    | 0,558     | 0,020           | 0,529                    |
| 0,25 cm <sup>2</sup>       | 0,330    | 0,345     | 0,021           | 0,313                    |
| Blutfleck<br>"männlich 75" |          |           |                 |                          |
| 2 cm <sup>2</sup>          | 0,017    | 0,042     | 0,024           |                          |
| 1 cm <sup>2</sup>          | 0,007    | 0,028     | 0,023           |                          |
| 0,5 cm <sup>2</sup>        | 0,004    | 0,025     | 0,022           |                          |
| 0,25 cm <sup>2</sup>       | 0,003    | 0,024     | 0,021           |                          |

#### Ergebnisinterpretation:

Wie in den vorausgehenden Versuchen zeigt sich auch in diesem Experiment eine Überlegenheit des Carbonat-Puffers gegenüber dem Glycin-Puffer. Wegen dieser wiederholt gemachten Erfahrung, daß nach Anwendung des Carbonat-Puffers höhere Extinktionswerte erzielt werden als nach Verwendung des Glycin-Puffers, soll in zukünftigen Versuchen auf vergleichende Untersuchungen mit dem Glycin-Puffer verzichtet werden. Diese Absicht erscheint auch insofern sinnvoll, als die angefertigten Blutflecken durch die Vielfalt der Untersuchungen und wegen der erforderlichen Menge für Proben und echte Leerwerte insbesondere durch Paralleluntersuchung mit Hilfe zweier verschiedener Puffer sehr schnell zur Neige gehen. Aus demselben Grund ist auch nicht immer die maximal mögliche Blutfleckengröße von 3 cm<sup>2</sup> verwendet worden.

Die bessere Eignung des Carbonat-Puffers gewinnt besonders dann Bedeutung, wenn nur geringe Mengen hitzestabiler alkalischer Phosphatase im Versuchsansatz enthalten sind, die even-

tuell mit dem Glycin-Puffer nicht mehr nachgewiesen werden können, während der Carbonat-Puffer unter anderem durch günstigeres pH-Optimum für die hitzestabile alkalische Phosphatase (vgl. Kap. B,5, S. 22/23 ) eine Steigerung in der Empfindlichkeit der Enzymreaktion bewirkt und über eine größere Menge umgesetzten Substrates zu höheren Extinktionswerten führt.

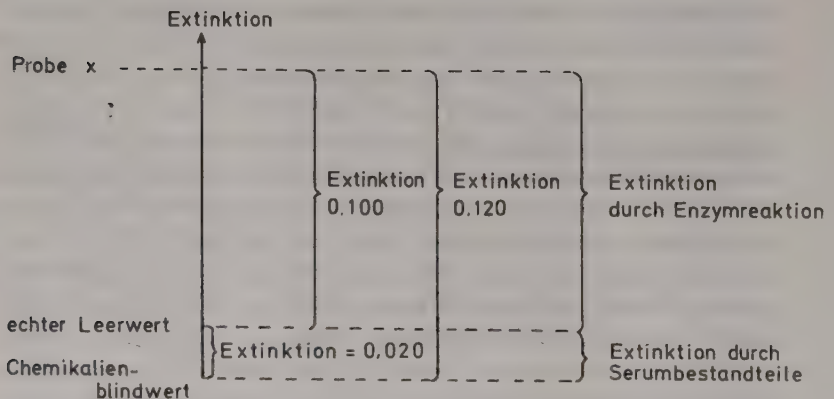
Bei der Beurteilung der Extinktionswerte im Hinblick auf die im Versuchsansatz enthaltene hitzestabile alkalische Phosphatase sind verschiedene Punkte zu beachten:

Mehr oder weniger hohe Extinktionswerte resultieren aus der Menge des in der Enzymreaktion freigesetzten gelben p-Nitrophenols. Dabei entsteht der Farbstoff durch Spaltung des Substrats Dinatrium-p-Nitrophenylphosphat mit Hilfe der katalytisch wirksamen hitzestabilen alkalischen Phosphatase, so daß sich deren im Versuchsansatz vorhandene Menge bzw. Aktivität mittelbar in den gemessenen Extinktionswerten widerspiegelt.

Es ist ersichtlich, daß auch bei Messung des echten Leerwertes gegen den Chemikalienblindwert ein geringer, von Null verschiedener Extinktionsbetrag festgestellt werden kann. Das wurde bei den Serumversuchen in Kap. B,3, S.18 damit erklärt, daß im echten Leerwert, im Gegensatz zum Chemikalienblindwert, das Serum als zusätzliche Substanz mit eingeht und eine minimale Extinktion gegenüber dem Chemikalienblindwert bewirkt. Diese in Serumversuchen gewonnene Erkenntnis kann auch auf die Blutfleckenversuche übertragen werden, da bei letzteren zwar getrocknete, durch Eluierung aber wieder in Lösung gegangene Serumbestandteile eine Rolle spielen dürften. Somit wäre auch eine gewisse Proportionalität der Extinktionswerte "echter Leerwert gegen Chemikalienblindwert" mit der verwendeten Blutfleckengröße zu erklären. Der Extinktionswert "echter Leerwert gegen Chemikalienblindwert" wird also einmal von unvermeidlichen minimalen Pipettierfehlern, zum anderen aber durch die im Ansatz enthaltene Blutmenge beeinflusst, wobei die Blutmenge wiederum von der Blutfleckengröße und zusätzlich von der unterschiedlichen Durchtränkung des Einzelläppchens abhängt.

Der im echten Leerwert gegenüber dem Chemikalienblindwert auftretende Extinktionsbetrag, der mit im echten Leerwert zusätzlich vorhandenen Serumbestandteilen erklärt wurde, ist in gleicher Weise sicherlich auch im Probenansatz der Blutflecken enthalten, so daß der Extinktionswert der Messung Probe gegen Chemikalienblindwert sich einmal aus dem durch Serumbestandteile resultierenden Extinktionsbetrag und darüber hinaus aus dem Betrag des in der Enzymreaktion freigesetzten Farbstoffes zusammensetzen wird. Der im echten Leerwert bei Messung gegen den Chemikalienblindwert auftretende Extinktionsbetrag wie der in der Probe bei Messung gegen den Chemikalienblindwert implizierte gleichartige Extinktionsbetrag kann dadurch eliminiert werden, daß bei der photometrischen Differenzmessung nicht der Chemikalienblindwert, sondern der echte Leerwert als Bezugs-Nullpunkt gewählt wird. Zur Veranschaulichung kann die folgende Darstellung (Fig. 6) herangezogen werden:

Fig. 6 (Erläuterung siehe Text)



Dieses Vorgehen ist nur dann absolut korrekt, wenn in Leerwert und Probe vollkommen gleiche Blutmengen enthalten sind, die - unabhängig von der in der Probe abgelaufenen Enzymreaktion - im Leerwert und Probe denselben Extinktionsbetrag gegenüber dem Chemikalienblindwert bewirken. Diese Blutmengen können jedoch nicht vollkommen gleich sein, da die Blutfleckengröße und die Durchtränkung der Lappchen variiert, und zwar in Leerwert und Probe unabhängig voneinander. Es kann also beispielsweise passieren, daß in der Probe relativ wenig Blut, im zugehörigen Leerwert gerade relativ viel Blut vorhanden ist, was in diesem theoretischen Fall zu niedrigen Extinktionswerten führen wird (ähnliches Problem vgl. Kapitel C, S. 23). Diese minimalen Unterschiede der in den Blutflecken enthaltenen Blutmenge werden dann relativ unbedeutend sein, wenn große Blutflecken mit viel hitzestabiler alkalischer Phosphatase verwendet werden, da dann auch bei Messung der Proben gegen die echten Leerwerte deutlich von Null verschiedene Extinktionswerte resultieren werden. Im umgekehrten Fall aber wird zu überlegen sein, wann ein solcher Wert noch relevant ist und zu der Aussage berechtigt, daß ein gefundener Extinktionsbetrag eindeutig auf das im Probenansatz vorhandene Enzym der hitzestabilen alkalischen Phosphatase zurückzuführen ist.

Wie schon früher ausgeführt wurde (vgl. Kapitel D,3, S.46/7) läßt sich eine in der Methodik implizierte Fehlerbreite besonders gut an den Extinktionswerten der Messung "echter Leerwert gegen Chemikalienblindwert" erkennen, da diese Werte ohne eine hier störende, Überlagernde Enzymreaktion zustandekommen. In diese Fehlerstreuung gehen neben Pipettierfehlern Abweichungen durch Unterschiede in Fleckengröße und Durchtränkungsintensität sowie eventuell unbeabsichtigt vorhandene Hämolyseprodukte mit ein. Obwohl zwischen den Extinktionswerten der Messung "echter Leerwert gegen Chemikalienblindwert" und der Blutfleckengröße eine zwar nicht konsequente, aber in der Tendenz doch erkennbare Proportionalität besteht, ist die durch die Fleckengröße bedingte Fehlerstreuung doch relativ gering, und es erscheint wenig sinnvoll, für jede

Fleckengröße eine Fehlerstrebubreite abzuschätzen, zumal die Fleckengröße - bedingt durch Durchtränkungsunterschiede - kein absolutes, feststehendes Maß darstellt.

Wenn also eine Unterscheidung der einzelnen Fehlerbeiträge nicht möglich ist, kann nur eine allgemeine Fehlerbreite bestimmt werden. Zieht man zu diesem Zweck nicht nur den letzten Versuch heran, in dem die Methodik durch Modifizierung bereits eine gewisse Präzision erlangt hat, sondern auch vorausgehende Versuche (bis auf den zur Groborientierung durchgeführten ersten Vorversuch), so ergibt sich sowohl für den Glycin- als auch für den Carbonat-Puffer eine Größenordnung der Extinktionswerte "echter Leerwert gegen Chemikalienblindwert" zwischen etwa 0,010 und 0,060 also von etwa maximal 0,050. Eine ähnliche Fehlerbreite muß man auch für die Proben aus Blutflecken annehmen; darstellbar ist die Fehlerstreuung dort jedoch nicht, da in den Proben zusätzlich die Enzymreaktion zur Auswirkung kommt.

Wenn man also von einem beliebigen gefundenen Extinktionswert der Messung "Probe gegen echten Leerwert" die Gesamtstrebubreite des Leerwertes und der Probe, d.h. einen Extinktionsbetrag von 0,100 abzieht, so sollte ein darüber hinaus verbleibender Extinktionswert auf die Wirkung der im Probenansatz enthaltenen hitzestabilen alkalischen Phosphatase zurückgeführt werden.

Dieses Vorgehen bedeutet eine strenge Beurteilung der Ergebnisse, da keine mittlere Streuung oder statistische Standardabweichung, sondern die gesamte, auch in den methodisch noch nicht ausgefeilten vorausgehenden Versuchen gefundene Strebubreite vom vorhandenen Ergebniswert abgezogen wird. Dieses Vorgehen scheint besonders deshalb geboten, weil bei Verwendung der Methode in der forensischen Praxis Fehldeutungen unbedingt vermieden werden müssen.

Kontrolliert man die den Blutflecken aus männlichem Probandenblut zugeordneten Extinktionswerte der Messung "Probe gegen echten Leerwert" aus vorausgehenden Versuchen nach dem oben angeführten Bewertungsmaßstab, so erkennt man, daß keiner der Extinktionswerte größer als 0,100 ausfällt und damit aus keinem dieser Blutflecken hitzestabile alkalische Phosphatase nachzuweisen ist.

Nun sind die Proben nicht nur gegen echte Leerwerte, sondern auch gegen Chemikalienblindwerte gemessen worden. Man könnte der Auffassung sein, daß hierbei nur in der Probe aus Blutflecken eine Fehlerstreuung auftritt, da der Chemikalienblindwert eine Größe darstellt, die bis auf minimale Pipettierfehler nur geringen Schwankungen unterlegen ist, so daß als Fazit von einem gefundenen Meßwert "Probe gegen Chemikalienblindwert" nur die in der Probe eventuell enthaltene Streubreite, also ein Extinktionsbetrag von 0,050 zu subtrahieren wäre. Bei solchem Vorgehen müßte es zu Fehlinterpretationen kommen, wovon man sich leicht überzeugen kann, denn der in diesem Fall um die Fehlerbreite der Probe reduzierte Extinktionsbetrag berücksichtigt noch nicht die Tatsache, daß auch ein echter Leerwert bei Messung gegen den Chemikalienblindwert einen geringen Extinktionswert aufweist, dessen Höhe nicht sicher abzuschätzen ist. Anders ausgedrückt läßt sich das Problem folgendermaßen darstellen: Bei Messung der Probe gegen den Chemikalienblindwert wird nicht allein der mit Schwankungen behaftete echte Leerwert durch eine feste Bezugsgröße, den Chemikalienblindwert, ersetzt, sondern es wird auch außer acht gelassen, daß der echte Leerwert nicht um den Wert des Chemikalienblindwertes schwankt, sondern um einen Mittelwert, der über dem Chemikalienblindwert liegt (vgl. Fig. 6).

Als dritte Möglichkeit der Extinktionsmessung bot es sich an, die jeweiligen Proben aus Schwangerenblutflecken gegen entsprechende Blutfleckenproben aus männlichem Blut zu messen.

Vor einer Bewertung dieses Vorgehens soll noch auf ein bisher nicht diskutiertes Phänomen eingegangen werden. Die aus dem männlichen Blut hergestellten Flecken liegen bei der Meßreihe "echter Leerwert gegen Chemikalienblindwert" in ähnlicher Größenordnung wie die Schwangerenblutflecken. Da in den Probenansätzen - zumal nach 40 min Erhitzen bei 60°C - keine hitzestabile alkalische Phosphatase enthalten sein soll und damit auch keine Enzymreaktion ablaufen soll, könnte man erwarten, daß auch bei Messung der "Probe gegen Chemikalienblindwert" Extinktionen in ähnlicher Größe wie bei den Leerwerten zu messen sind, bzw. daß bei Messung der Proben gegen die echten

Leerwerte Meßwerte nahe Null erzielt werden müßten. Das ist offensichtlich nicht der Fall, sondern es entstehen auch bei männlichen Blutflecken in der Messung "Probe gegen echte Leerwerte" Extinktionsbeträge, die zwar nahe Null, aber vorwiegend im positiven Bereich liegen. Zunächst wurde die Ursache hierfür im methodischen Versuchsablauf gesucht: Während beim echten Leerwert das Substrat erst nach der einstündigen Inkubation und nach Zugabe der Trichloressigsäure zugesetzt wurde, wird bei der Probe aus Blutflecken das Substrat schon vor der Inkubation zur Enzymreaktion zugegeben. Auch wenn bei Flecken aus männlichem Blut keine Enzymreaktion ablaufen sollte, so wäre es doch denkbar, daß eine ganz allmähliche spontane Spaltung des Substrates im Sinne einer Gleichgewichtsreaktion einsetzte. Diese Erklärung ist jedoch deshalb nicht stichhaltig, weil in jeder Probe dieselbe Menge an Substrat enthalten ist und die spontane Spaltung des Substrats in allen Proben gleich stark sein sollte. Es ist jedoch ersichtlich, daß auch bei Flecken männlichen Blutes bei Messung gegen den echten Leerwert ein schwacher, nicht konsequenter, aber in der Tendenz doch deutlicher Zusammenhang zwischen Blutfleckengröße und Höhe des Extinktionsbetrages besteht. Dieses Phänomen kann zur Zeit nur so gedeutet werden, daß auch in diesen Proben eine stark reduzierte Enzymreaktion abläuft, die allerdings nur Extinktionen hervorruft, die bei Schwangerenblutflecken der Größenordnung echter Leerwerte, gemessen gegen den Chemikalienblindwert, entsprechen.

Wenn also Flecken aus männlichem Probandenblut als Leerwert zur Extinktionsmessung bei Schwangerenblutflecken herangezogen werden, so sollten diese als "Probe" angesetzt werden (bei der das Substrat vor der Enteiweißung zugegeben wird, siehe Kapitel B,3), um den methodischen Fehler möglichst klein zu halten. Treten dann Extinktionen über 0,100 auf, so kann dieser Befund auf jeden Fall als zusätzliche Kontrolle zur Messung einer zu untersuchenden Probe gegen den echten Leerwert verwendet werden. Als einzige Bezugsgröße sollte sie jedoch nur mit Vorbehalt in den Fällen verwendet werden, in denen der unbekannte Blutfleck nicht ausreicht, um einen echten

Leerwert aus dem gleichen Material anzusetzen, da nur hier Variablen wie Stoffalter und -qualität mit der Probe am besten übereinstimmen.

Es soll noch eine Bemerkung darüber gemacht werden, inwieweit die Ergebnisse über die Menge der in den Proben enthaltenen hitzestabilen alkalischen Phosphatase Auskunft geben. Die Extinktionswerte der Messung "Probe gegen echten Leerwert" geben Auskunft über die Menge an in der Enzymreaktion freigesetztem p-Nitrophenol; die Menge des in der Enzymreaktion freigesetzten gelben Farbstoffes ist von der Menge an aktivem Enzym der im Probenansatz enthaltenen hitzestabilen alkalischen Phosphatase abhängig. Die Extinktionswerte sind also ein mittelbares Maß für die Menge enthaltener hitzestabiler alkalischer Phosphatase; eine direkte Maßeinheit, wie z.B. definierte Phosphatase-Einheiten würden eine Umrechnung erforderlich machen. Es stellt sich die Frage, ob eine solche Umrechnung sinnvoll ist und über die bestehenden Ergebnisse hinaus weiterreichende Informationen liefert. Obwohl die Methodik durch Abkehr von der Zentrifugiermethode und Übergang zur Filtriermethode sowie durch Einführen des Carbonat-Puffers sicherlich leistungsfähiger wurde, mußten bei der Ergebnisinterpretation Proben mit Extinktionsbeträgen unter 0,100 als nicht sicher phosphatasehaltig unberücksichtigt bleiben. Bei der zugrunde gelegten Fehlerbreite wäre eine quantitativ numerische Angabe über die enthaltene Menge an hitzestabiler alkalischer Phosphatase gewiß weniger sinnvoll und statt dessen eine allgemeinere Angabe nach "wenig - mittel - viel" vorzuziehen. Selbst bei einwandfrei festlegbaren numerischen Angaben wäre doch der Gehalt eines unbekannten Blutfleckens an hitzestabiler alkalischer Phosphatase abhängig vom Fleckenalter, vom Schwangerschaftsmonat, von individuellen Unterschieden, eventuell von der Anzahl der vorausgegangenen Schwangerschaften (BECK und CLARK), von der Anzahl der Feten (MERANZE et al.) und vielleicht anderen Gegebenheiten (Mutter stillend/nicht stillend, VERMEHREN, STEERT et al., Komplikationen während der Schwangerschaft, AOBA et al., MESSER).

Da bei einem unbekannten Blutfleck diese vielschichtigen

Variablen ebenfalls unbekannt sind und nicht getrennt berücksichtigt werden können, reduziert sich in der forensischen Praxis das Interesse auf die Frage:

Ist in dem betreffenden unbekannten Blutfleck überhaupt hitzestabile alkalische Phosphatase enthalten oder nicht, oder anders ausgedrückt: liegt dem Blutfleck Schwangerenblut zugrunde oder nicht, wobei nur der tatsächliche Nachweis der hitzestabilen alkalischen Phosphatase beweisend ist. Ist dagegen keine hitzestabile alkalische Phosphatase aus dem Versuchsansatz nachweisbar, so kann daraus nicht der Schluß gezogen werden, daß kein Schwangerenblutfleck vorliegt.

Bei Reduzierung der Fragestellung auf diese Alternativaussage, ob hitzestabile alkalische Phosphatase nachweisbar ist oder nicht, kann an eine weitere Versuchsverbesserung gedacht werden, nämlich an eine auf 24 h verlängerte Inkubation der Enzymreaktion. BESSEY, LOWRY und BROCK weisen darauf hin, daß sich die Enzymreaktion bereits bei einer über eine halbe Stunde hinausgehenden Inkubation nicht mehr sicher linear verhält. Diese Linearität ist für eine Alternativaussage jedoch nicht von Bedeutung, da lediglich eine sichere Unterscheidung von Schwangeren- und Nicht-Schwangerenblut möglich sein muß.

F Optimale Technik mit zusätzlicher Bestimmung der hitzestabilen alkalischen Phosphatase nach Verlängerung der Enzymreaktion auf 24 h

1. Ergebnisvergleich zwischen 1stündiger und 24stündiger Inkubation bei Untersuchung von Seren und Blutflecken mit und ohne Schimmelbildung

Im folgenden Versuch soll neben der 1stündigen Inkubation auch eine 24stündige Inkubation der Enzymreaktion durchgeführt werden. Hierbei wird von besonderem Interesse sein, ob neben den zu erwartenden höheren Extinktionswerten bei Schwangerenblutflecken auch die im vorigen Kapitel erwähnte, im Versuchsansatz mit Blutflecken aus männlichem Blut eventuell stark reduziert ablaufende Enzymreaktion zu erhöhten Extinktionswerten führen wird, und ob dann noch eine eindeutige Unterscheidung zwischen Blutflecken aus Schwangerenblut und aus Nicht-Schwangerenblut getroffen werden kann.

Eine Besonderheit gewinnt im folgenden Experiment zusätzliche Bedeutung: Zu Beginn der Blutfleckenversuche wurden vergleichend die entsprechenden Seren mituntersucht. Da die Blutflecken bei Zimmertemperatur aufbewahrt wurden, sollten auch die zugehörigen Seren - um bei vergleichenden Untersuchungen auch vergleichbare Ergebnisse zu erzielen - nicht im Kühlschrank, sondern ebenfalls bei Zimmertemperatur gelagert werden, wobei einige Röhrchen offen gelassen, andere mit Gummistöpsel verschlossen wurden. Unabhängig davon, ob die Röhrchen offen standen oder verschlossen waren, zeigten alle im folgenden Versuch verwendeten Seren eine Schimmelbildung, die sich zuweilen nicht als deutliche Schicht, sondern bei jüngeren Serumproben nur als dünnes, oberflächliches Häutchen beim Eintauchen der Pipette darstellte. Bei den zugehörigen Blutflecken konnte makroskopisch keine Schimmelbildung festgestellt werden; lediglich bei dem 18 Monate alten Blutflecken war ein leichter weißlicher Flaum sichtbar, der möglicherweise auf Schimmelbelag zurückzuführen ist. Dieser Blutfleck wurde mitverwendet und in üblicher Weise verarbeitet.

Eine Kontrolle über einen eventuell vorhandenen Schimmelfeinfluß erschien deshalb von Interesse, weil auch in der forensischen Praxis keine Einflußnahme auf die Lagerung der Blutflecken möglich ist und mit einer Schimmelbildung durchaus gerechnet werden muß.

Die Ergebnisse des Versuchs sind in den folgenden Tabellen 10a und 10b wiedergegeben.

Tab. 10a und 10b:

Befunde von Seren und Blutflecken mit und ohne Schimmelbildung; Vergleich der Ergebnisse nach 1 h und nach 24 h dauernder Enzymreaktion

Technische Daten:

Alter der Blutproben:

|                                          |           |                                                               |
|------------------------------------------|-----------|---------------------------------------------------------------|
| Schwangerenserum und -blutfleck Nr.1/75: | 20 Tage   | Blutflecken<br>ohne Schim-<br>mel, Serum<br>mit Schim-<br>mel |
| Schwangerenserum und -blutfleck Nr.3/75: | 19 Tage   |                                                               |
| Schwangerenserum und -blutfleck Nr.5/75: | 15 Tage   |                                                               |
| Schwangerenserum und -blutfleck Nr.6/75: | 15 Tage   |                                                               |
| Schwangerenserum und -blutfleck Nr.7/75: | 12 Tage   |                                                               |
| Schwangerenserum und -blutfleck Nr.8/75: | 12 Tage   | Blutfleck<br>mit Schim-<br>mel                                |
| Serum und Blutfleck "männlich 75":       | 17 Tage   |                                                               |
| Schwangerenblutfleck Nr.0/74:            | 18 Monate |                                                               |

Serummenge: 0,1 ml hämolysefreies Serum (mit Schimmel)

Blutfleckengröße: 0,5 - 3 cm<sup>2</sup>

Puffer: 0,5 ml Carbonat-Puffer

Eliminierung der hitzelabilen Phosphatase: 40 min bei 60°C  
im Warmluftschrank

Substratkonzentration: 0,5 ml Dinatrium-p-Nitrophenylphosphat  
(0,4430 g / 100 ml)

Enzymreaktion: 1 h / 24 h bei 37°C im Warmluftschrank

Unterbrechung der Enzymreaktion mit 1 ml 10%iger Trichloresigsäure

Filtern mit Filterpapier im Trichter

Alkalisieren: 0,5 ml klares Filtrat + 2 ml 0,2 N NaOH

Leerwert: echter Leerwert (e.L.), Chemikalienblindwert (Ch. Bl.), Messung der Schwangerenserum bzw. -blutflecken gegen Proben des männlichen Probanden (Pr.Schw./Pr.männl.75)

Extinktionsmessung: bei 405 nm im Eppendorf-Photometer

Tab. 10a: Befunde von Seren und Blutflecken mit und ohne Schimmelbildung; Dauer der Enzymreaktion 1 h

| Serum, Fleck 1/75                  | Pr./e.L. | Pr./Ch.Bl. | e.L./Ch.Bl. | Pr.Schw./Pr.männl.75 |
|------------------------------------|----------|------------|-------------|----------------------|
| hämolysefreies<br>Schwangerenserum | 0,067    | 0,084      | 0,019       | 0,067                |
| Fleck 1 cm <sup>2</sup>            | -        | 0,049      | -           | 0,024                |
| Serum, Fleck 3/75                  |          |            |             |                      |
| Fleck 2,5 cm <sup>2</sup>          | -        | 0,075      | -           | 0,051                |
| Fleck 1 cm <sup>2</sup>            | 0,042    | 0,066      | 0,024       | 0,038                |
| Serum, Fleck 5/75                  |          |            |             |                      |
| hämolysefreies<br>Schwangerenserum | 0,568    | 0,580      | 0,019       | 0,508                |
| Fleck 2,5 cm <sup>2</sup>          | 0,127    | 0,155      | 0,026       | 0,127                |
| Serum, Fleck 6/75                  |          |            |             |                      |
| hämolysefreies<br>Schwangerenserum | 0,286    | 0,309      | 0,023       | 0,278                |
| Fleck 2,5 cm <sup>2</sup>          | -        | 0,192      | -           | 0,158                |
| Serum, Fleck 7/75                  |          |            |             |                      |
| hämolysefreies<br>Schwangerenserum | 0,313    | 0,330      | 0,019       | 0,289                |
| Fleck 2 cm <sup>2</sup>            | 0,058    | 0,083      | 0,023       | 0,057                |
| Fleck 1 cm <sup>2</sup>            | 0,008    | 0,029      | 0,023       | 0,005                |
| Fleck 0,5 cm <sup>2</sup>          | 0,033    | 0,055      | 0,022       | 0,034                |
| Serum, Fleck 8/75                  |          |            |             |                      |
| hämolysefreies<br>Schwangerenserum | 0,426    | 0,443      | 0,019       | 0,395                |
| Fleck 2 cm <sup>2</sup>            | 0,062    | 0,086      | 0,025       | 0,063                |
| Fleck 1 cm <sup>2</sup>            | 0,062    | 0,079      | 0,020       | 0,051                |
| Fleck 0,5 cm <sup>2</sup>          | 0,033    | 0,052      | 0,020       | 0,029                |
| Fleck 0/74                         |          |            |             |                      |
| Fleck 3 cm <sup>2</sup>            | 0,023    | 0,054      | 0,031       | 0,025                |

| Serum, Fleck<br>"männl.75" | Pr./e.L. | Pr./Ch.Bl. | e.L./<br>Ch.Bl. | Pr.Schw./<br>Pr.männl.75 |
|----------------------------|----------|------------|-----------------|--------------------------|
| hämolysereies              |          |            |                 |                          |
| Serum                      | 0,026    | 0,046      | 0,021           |                          |
| Fleck 3 cm <sup>2</sup>    | 0,000    | 0,030      | 0,030           |                          |
| Fleck 2 cm <sup>2</sup>    | 0,005    | 0,028      | 0,031           |                          |
| Fleck 1 cm <sup>2</sup>    | 0,002    | 0,030      | 0,028           |                          |
| Fleck 0,5 cm <sup>2</sup>  | 0,001    | 0,026      | 0,026           |                          |

Tab. 10b: Befunde von Seren und Blutflecken mit und ohne Schimmelbildung; Dauer der Enzymreaktion 24 h

| Serum, Fleck 1/75         | Pr./e.L. | Pr./Ch.Bl. | e.L./<br>Ch.Bl. | Pr.Schw./<br>Pr.männl.75 |
|---------------------------|----------|------------|-----------------|--------------------------|
| hämolysereies             |          |            |                 |                          |
| Schwangerensserum         | >2,0     | >2,0       | 0,006           | >2,0                     |
| Fleck 1 cm <sup>2</sup>   | -        | 0,505      | -               | 0,479                    |
| Fleck 3/75                |          |            |                 |                          |
| Fleck 2,5 cm <sup>2</sup> | -        | 1,150      | -               | 1,070                    |
| Fleck 1 cm <sup>2</sup>   | 0,752    | 0,760      | 0,012           | 0,720                    |
| Serum, Fleck 5/75         |          |            |                 |                          |
| hämolysereies             |          |            |                 |                          |
| Schwangerensserum         | ∞        | ∞          | 0,006           | ∞                        |
| Fleck 2,5 cm <sup>2</sup> | >1,5     | >1,5       | 0,016           | >1,5                     |
| Serum, Fleck 6/75         |          |            |                 |                          |
| hämolysereies             |          |            |                 |                          |
| Schwangerensserum         | ∞        | ∞          | 0,008           | ∞                        |
| Fleck 2,5 cm <sup>2</sup> | -        | >2,0       | -               | >2,0                     |
| Serum, Fleck 7/75         |          |            |                 |                          |
| hämolysereies             |          |            |                 |                          |
| Schwangerensserum         | ∞        | ∞          | 0,006           | ∞                        |
| Fleck 2 cm <sup>2</sup>   | 1,090    | 1,090      | 0,011           | 1,030                    |
| Fleck 1 cm <sup>2</sup>   | 0,580    | 0,588      | 0,010           | 0,555                    |
| Fleck 0,5 cm <sup>2</sup> | 0,167    | 0,176      | 0,010           | 0,189                    |

| Serum, Fleck 8/75 | Pr./e.L. | Pr./Ch.Bl. | e.L./<br>Ch.Bl. | Pr.Schw./<br>Pr.männl.75 |
|-------------------|----------|------------|-----------------|--------------------------|
|-------------------|----------|------------|-----------------|--------------------------|

|                                    |          |          |       |          |
|------------------------------------|----------|----------|-------|----------|
| hämolysefreies<br>Schwangerenserum | $\infty$ | $\infty$ | 0,006 | $\infty$ |
| Fleck 2 cm <sup>2</sup>            | 1,440    | 1,440    | 0,011 | 1,380    |
| Fleck 1 cm <sup>2</sup>            | 0,659    | 0,670    | 0,013 | 0,625    |
| Fleck 0,5 cm <sup>2</sup>          | 0,825    | 0,825    | 0,010 | 0,755    |

|                         |       |       |       |       |
|-------------------------|-------|-------|-------|-------|
| Fleck 0/74              |       |       |       |       |
| Fleck 3 cm <sup>2</sup> | 0,447 | 0,475 | 0,019 | 0,550 |

Serum, Fleck "männl.75"

|                           |       |       |       |
|---------------------------|-------|-------|-------|
| hämolysefreies<br>Serum   | 0,456 | 0,470 | 0,007 |
| Fleck 3 cm <sup>2</sup>   | 0,014 | 0,042 | 0,022 |
| Fleck 2 cm <sup>2</sup>   | 0,013 | 0,036 | 0,017 |
| Fleck 1 cm <sup>2</sup>   | 0,018 | 0,042 | 0,018 |
| Fleck 0,5 cm <sup>2</sup> | 0,007 | 0,026 | 0,012 |

# Ergebnisinterpretation:

Bei der Erläuterung der Versuchsergebnisse sollen zunächst die Meßreihen betrachtet werden, denen Blutflecken aus männlichem Blut zugrunde liegen. Bei der 24stündigen Inkubation zeigen sich Extinktionserhöhungen, die aber in ihren absoluten Beträgen äußerst gering ausfallen. Wird der im vorausgehenden Abschnitt aufgestellte strenge Bewertungsmaßstab beibehalten, nach dem Extinktionen unter 0,100 unberücksichtigt bleiben sollen, so ist auch bei 24stündiger Inkubation aus den Blutflecken männlichen Blutes ganz sicher keine hitzestabile alkalische Phosphatase nachzuweisen. Der im vorigen Kapitel aus Versuchen mit 1stündiger Enzymreaktion erarbeitete Bewertungsmaßstab läßt sich insofern ebenso auf die 24stündige Inkubation anwenden, als auch hier keine größere Fehlerbreite der Messung "echter Leerwert gegen Chemikalienblindwert" auftritt.

Bei gleichem Bewertungsmaßstab ist auch aus den Schwangerenblutflecken nach 1stündiger Inkubation (bis auf Blutfleck 5) keine hitzestabile alkalische Phosphatase nachweisbar, wohl aber ganz deutlich nach 24stündiger Inkubation. Selbst bei dem

18 Monate alten Blutfleck 0/74 liegt ein Extinktionsbetrag von über 0,100 vor, was wegen des Schimmelbefalls vorsichtshalber zur Zeit nicht als Nachweis der hitzestabilen alkalischen Phosphatase interpretiert werden soll.

In bezug auf den Einfluß des Schimmels sind auch die Serumergebnisse von besonderem Interesse:

Nach 1stündiger Inkubation liegen die Extinktionswerte bei allen Seren - bis auf das relativ älteste Serum 1/75 (20 Tage) - über dem kritischen Wert von 0,100. Schon früher (Kapitel D,3 S. 46) wurde gesagt, daß aus 0,1 ml Serum mehr hitzestabile alkalische Phosphatase nachweisbar ist als aus einem sogar 3 cm<sup>2</sup> großen Blutfleck. Insofern wäre es auch in diesem Falle nicht verwunderlich, wenn aus 0,1 ml Serum noch ein Phosphatase-nachweis gelänge, dies aus maximal 2,5 cm<sup>2</sup> großen Blutflecken jedoch nicht mehr möglich wäre. In die gleiche Überlegung ließen sich auch die Ergebnisse bei 24stündiger Inkubation mit einbeziehen: Wenn bei der verlängerten Inkubationszeit der Nachweis von hitzestabiler alkalischer Phosphatase aus Blutflecken schon sicher möglich ist, so sollte der Nachweis aus den entsprechenden Seren noch weit deutlicher ausfallen.

Aus dem bisher Gesagten läßt sich also kein eindeutig auf die Anwesenheit des Schimmels beziehbarer Einfluß auf die Meßergebnisse ableiten. Zur Skepsis zwingt aber der Befund, daß bei 24stündiger Inkubation in der Probe des männlichen Serums eine Spaltung des Substrates und Freisetzung von p-Nitrophenol stattgefunden haben muß. Wenn auch für die Blutflecken aus männlichem Blut eine stark reduzierte Enzymreaktion diskutiert worden ist und ein deutlicherer Enzymnachweis aus 0,1 ml Serum gegenüber 3 cm<sup>2</sup> großen Blutflecken aus Schwangerenblut möglich ist, so erscheint doch die Diskrepanz zwischen der Probe aus männlichem Serum und den entsprechenden Blutfleckenproben bei 24stündiger Inkubation so kraß, daß die Erklärung mit einer reduziert ablaufenden Enzymreaktion nicht mehr befriedigen kann.

Da ein verschimmelter Blutfleck aus männlichem Blut in diesem Versuchsaufbau nicht zur Verfügung stand, läßt sich zur Zeit nicht eindeutig abklären, ob dem Schimmel eine sub-

stratspaltende Eigenschaft zukommt oder nicht. Da diese Frage für die Anwendung der Methode in der forensischen Praxis von enormer Bedeutung ist, weil bei dem Untersuchungsmaterial in Kriminalfällen durchaus mit verschimmelten Blutfleckenproben gerechnet werden muß, soll dieser Frage in späteren Versuchen nachgegangen werden. Die Serumversuche sowie die Messung des 18 Monate alten Blutflecks 0/74, die alle vom Problem des Schimmelbefalls betroffen sind, sollten deshalb zur Zeit nicht zur Ergebnisinterpretation im Sinne eines Nachweises der hitzestabilen alkalischen Phosphatase herangezogen werden.

Davon unberührt bleibt die Interpretation der Blutflecken-ergebnisse; sie berechtigen zu der Feststellung, daß auch bei 24stündiger Inkubation zwischen Schwangerenblutflecken und Nicht-Schwangerenblutflecken unterschieden werden kann. Durch die verlängerte Inkubationszeit wird eine ganz deutliche Empfindlichkeitssteigerung der Nachweisreaktion erreicht.

Bereits im Kapitel D,1 (S. 37) wurde auf die maximal verwendbare Blutfleckengröße von  $3 \text{ cm}^2$  der verwendeten Stoffart hingewiesen. Es wurde in Kapitel D,2 (S. 41) auch beschrieben, daß bei dort verwendeter 1stündiger Inkubation eine Mindestgröße von  $1 \text{ cm}^2$  wünschenswert ist, um zu sinnvollen Ergebnissen zu gelangen. Nach Einführen der 24stündigen Inkubation läßt sich festhalten, daß bei einem Blutfleckenalter von etwa 3 Wochen auch aus Blutfleckengrößen von  $0,5 \text{ cm}^2$  noch hitzestabile alkalische Phosphatase nachweisbar ist. Der Nachweis gelingt in diesen Fällen noch so deutlich, daß die berechtigte Hoffnung besteht, auch aus noch älteren Blutfleckenproben und eventuell sogar noch kleineren Fleckengrößen das Enzym nachweisen zu können. Für die routinemäßige Anwendung in der forensischen Praxis bedeutet das, daß zwar maximal nur soviel eines beliebigen Blutträgers verwendet werden darf, daß dieser von den hinzuzufügenden  $0,5 \text{ ml}$  Pufferlösung vollständig bedeckt ist, daß es umgekehrt aber durchaus einen Versuch wert ist, auch aus kleinsten Mengen Untersuchungsmaterials noch einen Enzymnachweis zu probieren.

Als Nebenfund sei wiederum erwähnt, daß bei Messung der

Proben aus Schwangerenblutflecken gegen Blutfleckenproben aus männlichem Blut ebenfalls sinnvolle Ergebnisse resultieren und als Ergänzung der Meßwerte "Probe gegen echten Leerwert" dienen können.

## 2. Untersuchung von bis zu 3 Monate alten Blutflecken bei 24stündiger Inkubation

Beim Nachweis der hitzestabilen alkalischen Phosphatase über einen bestimmten Zeitraum hinweg stellt sich die Frage, ob denn überhaupt eine Minderung des Enzyms als Alterungsvorgang nach Ablauf eines Zeitraums eintritt, oder ob das Enzym ein resistentes Merkmal des Schwangerenblutes darstellt. Bereits in dem Versuch über die Eliminierung der hitzelabilen alkalischen Phosphatase (Kapitel B,6, S.25/6) zeigte sich nach einer Erhitzung auf 60°C für länger als 40 min, daß dann auch die hitzestabile alkalische Phosphatase einer allmählich fortschreitenden geringfügigen Eliminierung unterworfen ist. Diese unter künstlichen Laborbedingungen im Schwangerenserum stattfindende Inaktivierung des Enzyms läßt sich bei den Blutflecken, die bei Zimmertemperatur einem normalen Alterungsprozeß unterlagen, nicht in gleicher Weise deutlich darstellen, da hier in verschiedenen Zeitabständen verschiedene Blutfleckengrößen mit unterschiedlicher Durchtränkung verwendet wurden. Um eine zeitbedingte Abnahme der Enzymaktivität dennoch zu erfassen, sollen aus den vorausgehenden Versuchen mit einstündiger Inkubation drei Beispiele herangezogen werden:

Zusammenstellung bereits erhobener Befunde aus Tab. 9 und 10a zur Darstellung einer Abnahme der Enzymaktivität im Verlauf der Zeit (siehe Text).

| Fleck | Alter  | Größe | Extinktion      | Alter   | Größe | Extinktion      |
|-------|--------|-------|-----------------|---------|-------|-----------------|
| 3/75  | 7 Tage | 2     | cm <sup>2</sup> | 19 Tage | 2,5   | cm <sup>2</sup> |
|       |        | 1     | cm <sup>2</sup> |         |       |                 |
|       |        | 0,5   | cm <sup>2</sup> |         |       |                 |
|       |        | 0,25  | cm <sup>2</sup> |         |       |                 |
|       |        |       | 0,542           |         |       | 0,051           |
|       |        |       | 0,335           |         |       | 0,042           |
|       |        |       | 0,229           |         |       |                 |
|       |        |       | 0,186           |         |       |                 |
| 5/75  | 5 Tage | 1     | cm <sup>2</sup> | 15 Tage | 2,5   | cm <sup>2</sup> |
|       |        | 0,5   | cm <sup>2</sup> |         |       |                 |
|       |        | 0,25  | cm <sup>2</sup> |         |       |                 |
|       |        |       |                 |         |       |                 |
|       |        |       | 0,450           |         |       | 0,127           |
|       |        |       | 0,521           |         |       |                 |
|       |        |       | 0,058           |         |       |                 |
| 6/75  | 5 Tage | 0,5   | cm <sup>2</sup> | 15 Tage | 2,5   | cm <sup>2</sup> |
|       |        | 0,25  | cm <sup>2</sup> |         |       |                 |
|       |        |       |                 |         |       |                 |
|       |        |       |                 |         |       |                 |
|       |        |       | 0,540           |         |       | 0,158           |
|       |        |       | 0,330           |         |       |                 |

Während bei dem 7 Tage alten nur 0,25 cm<sup>2</sup> großen Blutfleck 3/75 noch hitzestabile alkalische Phosphatase nachweisbar ist, ist dies aus einem sogar 2,5 cm<sup>2</sup> großen Stück desselben Flekens nach 19 Tagen nicht mehr möglich.

Während 0,5 cm<sup>2</sup> große und 5 Tage alte Teilflecken der Blutflecken 5/75 und 6/75 noch beträchtliche Extinktionswerte aufweisen, sind diese nach 15 Tagen und sogar bei einer Ausgangsgröße von 2,5cm<sup>2</sup> doch merklich reduziert.

Diese Minderung der hitzestabilen alkalischen Phosphatase in bei Zimmertemperatur gelagerten Schwangerenblutflecken scheint immerhin so stark zu sein, daß mit der Methode der 1stündigen Enzymreaktion sehr schnell die Grenze der Nachweisbarkeit erreicht wird.

Eine längere Nachweismöglichkeit ergibt sich mit der auf 24 h verlängerten Enzymreaktion. Sie soll in den beiden folgenden Versuchen dazu dienen, einen Enzymnachweis noch nach längerer Lagerungszeit der Blutflecken zu führen. Die Versuche mit 1stündiger Inkubation sind zur parallelen Vergleichsmöglichkeit mit durchgeführt. Die Ergebnisse sind in den folgenden Tab. 11a,b, 12a,b, 13a,b wiedergegeben.

Tab. 11:

Untersuchung von etwa 6 Wochen alten Blutflecken;

Dauer der Enzymreaktion 1 h und 24 h

Technische Daten:

Alter der Blutproben:

Schwangerenblutfleck Nr. 3/75: 48 Tage  
 Schwangerenblutfleck Nr. 5/75: 46 Tage  
 Schwangerenblutfleck Nr. 7/75: 43 Tage  
 Schwangerenblutfleck Nr. 8/75: 43 Tage  
 Schwangerenblutfleck Nr. 9/75: 38 Tage  
 Schwangerenblutfleck Nr. 10/75: 38 Tage  
 Schwangerenblutfleck Nr. 11/75: 37 Tage  
 Schwangerenblutfleck Nr. 13/75: 35 Tage  
 Blutfleck "männlich 75"<sup>2</sup> : 48 Tage

Blutfleckengröße: 1 - 3 cm<sup>2</sup>

Puffer: 0,5 ml Carbonat-Puffer

Eliminierung der hitzelabilen Phosphatase: 40 min bei 60°C  
 im Warmluftschrank

Substratkonzentration: 0,5 ml Dinatrium-p-Nitrophenylphosphat (0,4430 g / 100 ml)

Enzymreaktion: 1 h / 24 h bei 37°C im Warmluftschrank

Unterbrechung der Enzymreaktion mit 1 ml 10%iger Trichlor-essigsäure

Filtern mit Filterpapier im Trichter

Alkalisieren: 0,5 ml klares Filtrat + 2 ml 0,2 N NaOH

Leerwert: echter Leerwert (e.L.), Chemikalienblindwert

(Ch.Bl.), Messung der Schwangerenblutflecken gegen Proben des männlichen Probanden (Pr.Schw./Pr.männl.75)

Extinktionsmessung: bei 405 nm im Eppendorf-Photometer

Tab. 11a: Untersuchung von etwa 6 Wochen alten Blutflecken:

Dauer der Enzymreaktion 1 h

| Fleck             | Pr./e.L. | Pr./Ch.Bl. | e.L./Ch.Bl. |
|-------------------|----------|------------|-------------|
| Fleck 3/75        |          |            |             |
| 1 cm <sup>2</sup> | 0,020    | 0,023      | -0,002      |
| Fleck 5/75        |          |            |             |
| 1 cm <sup>2</sup> | 0,064    | 0,067      | -0,002      |
| Fleck 7/75        |          |            |             |
| 3 cm <sup>2</sup> | 0,054    | 0,050      | 0,000       |
| 2 cm <sup>2</sup> | 0,062    | 0,069      | 0,000       |
| 1 cm <sup>2</sup> | 0,032    | 0,037      | -0,002      |
| Fleck 8/75        |          |            |             |
| 3 cm <sup>2</sup> | 0,109    | 0,116      | 0,000       |
| 2 cm <sup>2</sup> | 0,027    | 0,032      | -0,003      |
| 1 cm <sup>2</sup> | 0,017    | 0,021      | -0,002      |

| Fleck 9/75        | Pr./e.L. | Pr./Ch.Bl. | e.L./Ch.Bl. |
|-------------------|----------|------------|-------------|
| 3 cm <sup>2</sup> | 0,084    | 0,091      | 0,003       |
| 2 cm <sup>2</sup> | 0,036    | 0,046      | -0,001      |
| 1 cm <sup>2</sup> | 0,025    | 0,033      | -0,002      |

| Fleck 10/75       |       |       |        |
|-------------------|-------|-------|--------|
| 3 cm <sup>2</sup> | 0,078 | 0,085 | 0,001  |
| 2 cm <sup>2</sup> | 0,107 | 0,109 | -0,002 |
| 1 cm <sup>2</sup> | 0,032 | 0,039 | -0,002 |

| Fleck 11/75       |       |       |        |
|-------------------|-------|-------|--------|
| 3 cm <sup>2</sup> | 0,053 | 0,054 | -0,003 |
| 2 cm <sup>2</sup> | 0,062 | 0,067 | -0,003 |
| 1 cm <sup>2</sup> | 0,024 | 0,028 | -0,003 |

| Fleck 13/75       |       |       |        |
|-------------------|-------|-------|--------|
| 3 cm <sup>2</sup> | 0,010 | 0,011 | -0,003 |
| 2 cm <sup>2</sup> | 0,024 | 0,029 | -0,001 |
| 1 cm <sup>2</sup> | 0,003 | 0,013 | -0,001 |

| Fleck männl.75    |         |       |        |
|-------------------|---------|-------|--------|
| 3 cm <sup>2</sup> | -0,009  | 0,007 | 0,004  |
| 2 cm <sup>2</sup> | - 0,008 | 0,003 | 0,000  |
| 1 cm <sup>2</sup> | -0,008  | 0,002 | -0,001 |

Tab. 11b: Untersuchung von etwa 6 Wochen alten Blutflecken;  
Dauer der Enzymreaktion 24 h

| Fleck 3/75        | Pr./e.L. | Pr./Ch.Bl. | e.L./Ch.Bl. | Pr.Schw./<br>Pr.männl.75 |
|-------------------|----------|------------|-------------|--------------------------|
| 1 cm <sup>2</sup> | 0,785    | 0,800      | 0,024       | 0,800                    |

| Fleck 5/75        |     |     |       |     |
|-------------------|-----|-----|-------|-----|
| 1 cm <sup>2</sup> | 1,7 | 1,7 | 0,024 | 1,6 |

| Fleck 7/75        |       |       |       |       |
|-------------------|-------|-------|-------|-------|
| 3 cm <sup>2</sup> | 1,5   | 1,6   | 0,025 | 1,47  |
| 2 cm <sup>2</sup> | 0,436 | 0,521 | 0,015 | 0,497 |
| 1 cm <sup>2</sup> | 0,581 | 0,600 | 0,010 | 0,572 |

| Fleck 8/75        |       |       |       |       |
|-------------------|-------|-------|-------|-------|
| 3 cm <sup>2</sup> | 1,0   | 1,0   | 0,018 | 1,04  |
| 2 cm <sup>2</sup> | 0,676 | 0,720 | 0,017 | 0,762 |
| 1 cm <sup>2</sup> | 0,690 | 0,720 | 0,008 | 0,711 |

| Fleck 9/75        | Pr./e.L. | Pr./Ch.Bl. | e.L./Ch.Bl. | Pr.Schw./<br>Pr.männl.75 |
|-------------------|----------|------------|-------------|--------------------------|
| 3 cm <sup>2</sup> | > 2      | < ∞        | 0,018       | < ∞                      |
| 2 cm <sup>2</sup> | 1,9      | 2,0        | 0,016       | 1,99                     |
| 1 cm <sup>2</sup> | 1,17     | 1,24       | 0,014       | 1,18                     |
| Fleck 10/75       |          |            |             |                          |
| 3 cm <sup>2</sup> | 1,9      | 1,9        | 0,018       | 1,8                      |
| 2 cm <sup>2</sup> | 1,6      | 1,7        | 0,018       | 1,6                      |
| 1 cm <sup>2</sup> | 0,749    | 0,83       | 0,014       | 0,790                    |
| Fleck 11/75       |          |            |             |                          |
| 3 cm <sup>2</sup> | 1,35     | 1,35       | 0,017       | 1,24                     |
| 2 cm <sup>2</sup> | 1,08     | 1,13       | 0,019       | 1,05                     |
| 1 cm <sup>2</sup> | 0,810    | 0,83       | 0,015       | 0,780                    |
| Fleck 13/75       |          |            |             |                          |
| 3 cm <sup>2</sup> | 0,500    | 0,540      | 0,022       | 0,471                    |
| 2 cm <sup>2</sup> | 0,374    | 0,410      | 0,022       | 0,365                    |
| 1 cm <sup>2</sup> | 0,291    | 0,320      | 0,018       | 0,281                    |
| Fleck männl.75    |          |            |             |                          |
| 3 cm <sup>2</sup> | 0,007    | 0,054      | 0,030       |                          |
| 2 cm <sup>2</sup> | -0,008   | 0,030      | 0,025       |                          |
| 1 cm <sup>2</sup> | -0,005   | 0,025      | 0,017       |                          |

Tab. 12:

Untersuchung von etwa 11 Wochen alten Blutflecken:

Dauer der Enzymreaktion 1 h und 24 h

Technische Daten:

Alter der Blutproben:

Schwangerenblutfleck Nr. 7/75: 78 Tage

Schwangerenblutfleck Nr. 8/75: 78 Tage

Schwangerenblutfleck Nr. 9/75: 73 Tage

Schwangerenblutfleck Nr. 10/75: 73 Tage

Schwangerenblutfleck Nr. 11/75: 72 Tage

Schwangerenblutfleck Nr. 12/75: 72 Tage

Schwangerenblutfleck Nr. 13/75: 70 Tage

Schwangerenblutfleck Nr. 14/75: 70 Tage

Blutfleck "männlich 75": 82 Tage

Blutfleckengröße: 1,5 - 3 cm<sup>2</sup>

Puffer: 0,5 ml Carbonat-Puffer

Eliminierung der hitzelabilen Phosphatase: 40 min bei 60°C  
im Warmluftschrank

Substratkonzentration: 0,5 ml Dinatrium-p-Nitrophenylphosphat (0,4430 g / 100 ml)

Enzymreaktion: 1 h / 24 h bei 37°C im Warmluftschrank

Unterbrechung der Enzymreaktion mit 1 ml 10%iger Trichlor-  
essigsäure

Filtern mit Filterpapier im Trichter

Alkalisieren: 0,5 ml klares Filtrat + 2 ml 0,2 N NaOH

Leerwert: echter Leerwert (e.L.), Chemikalienblindwert

(Ch.Bl.), Messung der Schwangerenblutflecken gegen

Proben des männlichen Probanden (Pr.Schw./Pr.männl.75)

Extinktionsmessung bei 405 nm im Eppendorf-Photometer

Tab. 12a: Untersuchung von etwa 11 Wochen alten Blutflecken;  
Dauer der Enzymreaktion 1 h

| Fleck<br>Nr. | Größe<br>in cm <sup>2</sup> | Pr./e.L. | Pr./Ch.Bl. | e.L./Ch.Bl. | Pr.Schw./<br>Pr.männl.75 |
|--------------|-----------------------------|----------|------------|-------------|--------------------------|
| 7/75         | 2,5                         | 0,097    | 0,111      | 0,012       | 0,093                    |
| 8/75         | 3                           | 0,159    | 0,169      | 0,013       | 0,149                    |
| 9/75         | 1,5                         | 0,082    | 0,098      | 0,011       | 0,084                    |
| 10/75        | 3                           | 0,046    | 0,059      | 0,007       | 0,043                    |
| 11/75        | 3                           | 0,076    | 0,083      | 0,008       | 0,066                    |
| 12/75        | 3                           | 0,093    | 0,097      | 0,003       | 0,081                    |
| 13/75        | 3                           | 0,038    | 0,052      | 0,010       | 0,037                    |
| 14/75        | 3                           | 0,009    | 0,022      | 0,010       | 0,007                    |
| männl.<br>75 | 3                           | -0,003   | 0,013      | 0,015       |                          |

Tab. 12b: Untersuchung von etwa 11 Wochen alten Blutflecken;  
Dauer der Enzymreaktion 24 h

| Fleck<br>Nr. | Größe<br>in cm <sup>2</sup> | Pr./e.L. | Pr./Ch.Bl. | e.L./Ch.Bl. | Pr.Schw./<br>Pr.männl.75 |
|--------------|-----------------------------|----------|------------|-------------|--------------------------|
| 7/75         | 2,5                         | 1,19     | 1,21       | 0,034       | 1,16                     |
| 8/75         | 3                           | 1,22     | 1,24       | 0,029       | 1,20                     |
| 9/75         | 1,5                         | 1,8      | 1,8        | 0,026       | 1,7                      |
| 10/75        | 3                           | 1,13     | 1,19       | 0,035       | 1,19                     |
| 11/75        | 3                           | 1,25     | 1,26       | 0,028       | 1,23                     |
| 12/75        | 3                           | 0,631    | 0,692      | 0,028       | 0,689                    |
| 13/75        | 3                           | 0,620    | 0,660      | 0,032       | 0,625                    |
| 14/75        | 3                           | 0,221    | 0,276      | 0,034       | 0,265                    |
| männl.<br>75 | 3                           | 0,008    | 0,038      | 0,032       |                          |

Tab. 13:

Untersuchung von etwa 3 Monate alten Blutflecken;

Dauer der Enzymreaktion 1 h und 24 h

Technische Daten:

Alter der Blutproben:

Schwangerenblutfleck Nr. 10/75: 3 Monate

Schwangerenblutfleck Nr. 11/75: 3 Monate

Schwangerenblutfleck Nr. 12/75: 3 Monate

Schwangerenblutfleck Nr. 13/75: 3 Monate

Schwangerenblutfleck Nr. 14/75: 3 Monate

Blutfleck "männlich 75": 3 Monate

Blutfleckengröße: 1 - 3 cm<sup>2</sup>

Puffer: 0,5 ml Carbonat-Puffer

Eliminierung der hitzelabilen Phosphatase: 40 min bei 60°C  
im Warmluftschrank

Substratkonzentration: 0,5 ml Dinatrium-p-Nitrophenylphosphat (0,4430 g / 100 ml)

Enzymreaktion: 1 h / 24 h bei 37°C im Warmluftschrank

Unterbrechung der Enzymreaktion mit 1 ml 10%iger Trichloroessigsäure

Filtern mit Filterpapier im Trichter

Alkalisieren: 0,5 ml klares Filtrat + 2 ml 0,2 N NaOH

Leerwert: echter Leerwert (e.L.), Chemikalienblindwert

(Ch.Bl.), Messung der Schwangerenblutflecken gegen Proben des männlichen Probanden (Pr.Schw./Pr.männl.75)

Extinktionsmessung: bei 405 nm im Eppendorf-Photometer

Tab. 13a: Untersuchung von etwa 3 Monate alten Blutflecken;

Dauer der Enzymreaktion 1 h

| Fleck Nr. | Größe<br>in cm <sup>2</sup> | Pr./e.L. | e.L./Ch.Bl. |
|-----------|-----------------------------|----------|-------------|
| 10/75     | 3                           | 0,033    | 0,013       |
| 11/75     | 3                           | 0,089    | 0,012       |
| 12/75     | 3                           | 0,021    | 0,010       |
| 13/75     | 1                           | 0,048    | 0,008       |
| 14/75     | 3                           | 0,011    | 0,016       |
| männl.75  | 3                           | 0,002    | 0,023       |

Tab. 13b: Untersuchung von etwa 3 Monate alten Blutflecken;

Dauer der Enzymreaktion 24 h

| Fleck Nr. | Größe | Pr./e.L. | e.L./Ch.Bl. | Pr.Schw./Pr.männl.75 |
|-----------|-------|----------|-------------|----------------------|
| 10/75     | 3     | 1,5      | 0,012       | 1,45                 |
| 11/75     | 3     | 1,3      | 0,011       | 1,25                 |
| 12/75     | 3     | 0,520    | 0,015       | 0,522                |
| 13/75     | 1     | 0,450    | 0,007       | 0,411                |
| 14/75     | 3     | 0,456    | 0,017       | 0,416                |
| männl.75  | 3     | 0,027    | 0,014       |                      |

### Ergebnisinterpretation:

Bei Betrachtung der Ergebnisse aus den Tab. 11a, 12a und 13a zeigt sich, daß sich bei 1stündiger Enzymreaktion aus dem 2 cm<sup>2</sup> großen und 38 Tage alten Blutfleck 10 noch hitzestabile alkalische Phosphatase nachweisen läßt (vgl. Tab. 11a). Ebenso gelingt ein Enzymnachweis noch aus dem 3 cm<sup>2</sup> großen und 78 Tage alten Blutfleck 8 (vgl. Tab. 12a). Demgegenüber ist aus keinem der in Tab. 13a verwendeten, etwa 3 Monate alten Blutflecken hitzestabile alkalische Phosphatase mit der Methode 1stündiger Inkubation mehr nachzuweisen.

Die in den Tab. 11b, 12b und 13b aufgeführten Ergebnisse nach 24stündiger Inkubation gestatten in erfreulicher Deutlichkeit einen Enzymnachweis aus allen mit Schwangerenblut getränkten Blutflecken. Demgegenüber sind die Extinktionswerte der mit männlichem Probandenblut getränkten Flecke so deutlich gering ausgefallen, daß aus ihnen kein Enzymnachweis möglich ist und damit wie erwartet und gewünscht eine klare Unterscheidung zwischen Blutflecken aus Schwangerenblut und aus Nicht-Schwangerenblut möglich ist.

Es sei noch einmal darauf hingewiesen, daß der für den Enzymnachweis in Kapitel E, S.58 aufgestellte Bewertungsmaßstab - der sich an der Fehlerbreite der Messung "echter Leerwert gegen Chemikalienblindwert" orientiert und nach welchem Extinktionswerte unter 0,100 nicht zum Enzymnachweis herangezogen werden sollen - auch auf Versuche mit 24stündiger Enzymreaktion anwendbar ist, da dort keine größere Streubreite der Extinktionswerte "echter Leerwert gegen Chemikalienblindwert" auftritt als bei 1stündiger Inkubation.

Als markantestes Ergebnis dieses Versuchs soll abschließend hervorgehoben werden, daß mit der Methode der 24stündigen Inkubation ein Nachweis der hitzestabilen alkalischen Phosphatase aus 3 Monate alten und im Fall des Blutflecks 13/75 nur 1 cm<sup>2</sup> großen Blutflecken möglich ist. Dieser Enzymnachweis, sowie die Unterscheidung zwischen Blutflecken aus Schwangerenblut und solchen aus Nicht-Schwangerenblut gelingt noch so deutlich, daß im folgenden Versuch die Leistungen der Methode an noch wesentlich älteren Blutflecken getestet werden soll.

### 3. Untersuchung von bis zu 19 Monate alten Blutflecken bei 24stündiger Inkubation

In diesem Experiment sollte versucht werden, die hitzestabile alkalische Phosphatase noch in maximal 19 Monaten alten Blutflecken aus venösem Schwangerenblut nachzuweisen.

Daneben standen auch drei 20 Monate alte Blutflecken aus Placentablut zur Verfügung, die zum Vergleich mituntersucht wurden. Diese Flecken waren auf Baumwollstoffen aufgebracht, die in der Qualität dicker oder dünner als die in dieser Arbeit sonst generell verwendeten Leinenläppchen waren.

Ferner lag ein 6 Jahre alter und teilweise mit Schimmel behafteter Blutfleck eines anderen männlichen Probanden vor. Da in Kapitel F,1 S. 68 die Möglichkeit einer eventuell durch Schimmel verursachten Substratspaltung nicht völlig ausgeschlossen werden konnte, sollte dieser Blutfleck dazu dienen, möglicherweise eine Klärung des Problems herbeizuführen. Dazu wurden aus dem Gesamtflecken verschimmelte und nicht verschimmelte Teilflecken gebildet und vergleichend untersucht.

Die Ergebnisse dieses Versuchs sind in den Tabellen 14a,b zusammengefaßt.

#### Tab. 14:

Untersuchung von maximal 19 Monate alten, teilweise mit Schimmel behafteten Blutflecken; Dauer der Enzymreaktion 1 h und 24 h

#### Technische Daten:

##### Alter der Blutproben:

|                                 |                              |
|---------------------------------|------------------------------|
| Schwangerenblutfleck Nr. 2/74:  | 19 Monate                    |
| Schwangerenblutfleck Nr. 3/74:  | 19 Monate                    |
| Schwangerenblutfleck Nr. 4/74:  | 19 Monate                    |
| Schwangerenblutfleck Nr. 5/74:  | 19 Monate                    |
| Schwangerenblutfleck Nr. 6/74:  | 19 Monate                    |
| Schwangerenblutfleck Nr. 7/74:  | 19 Monate                    |
| Schwangerenblutfleck Nr. 8/74:  | 18 Monate                    |
| Schwangerenblutfleck Nr. 9/74:  | 18 Monate                    |
| Schwangerenblutfleck Nr. 10/74: | 18 Monate                    |
| Schwangerenblutfleck Nr. 11/74: | 17 Monate                    |
| Schwangerenblutfleck Nr. 12/74: | 17 Monate                    |
| Blutfleck Placenta L Nr. 1      | : 20 Monate (dünnerer Stoff) |
| Blutfleck Placenta M Nr. 2      | : 20 Monate (dickerer Stoff) |

Blutfleck Placenta - Nr.3: 20 Monate (dünnerer Stoff)  
 Blutfleck "männlich 69" : 6 Jahre (ohne Schimmel)  
 Blutfleck "männlich 69" : 6 Jahre (mit Schimmel)  
 Blutfleck "männlich 75" : 3 Monate (ohne Schimmel)  
 Blutfleckengröße: 1 - 5 cm<sup>2</sup>  
 Puffer: 0,5 ml Carbonat-Puffer  
 Eliminierung der hitzelabilen Phosphatase: 40 min bei 60°C  
 im Warmluftschrank  
 Substratkonzentration: 0,5 ml Dinatrium-p-Nitrophenylphosphat (0,4430 g / 100 ml)  
 Enzymreaktion: 1 h / 24 h bei 37°C im Warmluftschrank  
 Unterbrechung der Enzymreaktion mit 1 ml 10%iger Trichlor-essigsäure  
 Filtern mit Filterpapier im Trichter  
 Alkalisieren: 0,5 ml klares Filtrat + 2 ml 0,2 N NaOH  
 Leerwert: echter Leerwert (e.L.), Chemikalienblindwert (Ch.Bl.), Messung der Schwangerenblutflecken gegen Proben des männlichen Probanden (Pr.Schw./Pr.männl.75)  
 Extinktionsmessung: bei 405 nm im Eppendorf-Photometer

Tab. 14a: Untersuchung von maximal 19 Monate alten, teilweise mit Schimmel behafteten Blutflecken;  
 Dauer der Enzymreaktion 1 h

| Fleck Nr.      | Größe<br>in cm <sup>2</sup> | Pr./e.L. | e.L./Ch.Bl. |
|----------------|-----------------------------|----------|-------------|
| 2/74           | 3                           | 0,035    | 0,024       |
| 3/74           | 3                           | 0,021    | 0,026       |
| 4/74           | 3                           | 0,046    | 0,016       |
| 5/74           | 3                           | 0,028    | 0,025       |
| 6/74           | 3                           | 0,071    | 0,020       |
| 7/74           | 2                           | 0,009    | 0,014       |
| 8/74           | 1                           | 0,019    | 0,009       |
| 9/74           | 1                           | 0,010    | 0,008       |
| 10/74          | 3                           | 0,078    | 0,026       |
| 11/74          | 3                           | 0,089    | 0,022       |
| 12/74          | 3                           | 0,013    | 0,030       |
| Placenta 1     | 5                           | ∞        | 0,043       |
| Placenta 2     | 2                           | > 2      | 0,025       |
| Placenta 3     | 4                           | 0,800    | 0,027       |
| männl./69 o.S. | 3                           | 0,014    | 0,051       |
| männl./69 + S. | 3                           | 0,003    | 0,057       |
| männl./75 o.S. | 3                           | 0,002    | 0,023       |

Tab. 14b: Untersuchung von maximal 19 Monate alten, teilweise mit Schimmel behafteten Blutflecken;  
Dauer der Enzymreaktion 24 h

| Fleck Nr.      | Größe<br>in cm <sup>2</sup> | Pr./e.L. | e.L./Ch.Bl. | Pr.Schw./<br>Pr.männl.75 |
|----------------|-----------------------------|----------|-------------|--------------------------|
| 2/74           | 3                           | 0,675    | 0,029       | 0,640                    |
| 3/74           | 3                           | 0,404    | 0,030       | 0,398                    |
| 4/74           | 3                           | 0,950    | 0,013       | 0,910                    |
| 5/74           | 3                           | 0,925    | 0,019       | 0,900                    |
| 6/74           | 3                           | 1,8      | 0,019       | 1,75                     |
| 7/74           | 2                           | 0,244    | 0,014       | 0,214                    |
| 8/74           | 1                           | 0,319    | 0,005       | 0,305                    |
| 9/74           | 1                           | 0,284    | 0,005       | 0,246                    |
| 10/74          | 3                           | 1,5      | 0,023       | 1,4                      |
| 11/74          | 3                           | 0,356    | 0,017       | 0,320                    |
| 12/74          | 3                           | 0,284    | 0,029       | 0,250                    |
| Placenta 1     | 5                           | ∞        | 0,048       | ∞                        |
| Placenta 2     | 2                           | ∞        | 0,019       | ∞                        |
| Placenta 3     | 4                           | ∞        | 0,023       | ∞                        |
| männl./69 o.S. | 3                           | 0,065    | 0,055       | 0,075                    |
| männl./69 + S. | 3                           | 0,055    | 0,053       | 0,062                    |
| männl./75 o.S. | 3                           | 0,027    | 0,014       |                          |

#### Ergebnisinterpretation:

Aus Tab. 14a geht hervor, daß aus Blutflecken venösen Schwangerenblutes bei 1stündiger Inkubation keine hitzestabile alkalische Phosphatase nachweisbar ist, was nicht verwundert, da bei 1stündiger Inkubation im vorausgehenden Versuch der Enzymnachweis bei nur 3 Monate alten Blutflecken bereits nicht mehr gelang.

Um so überraschender erscheinen deshalb die sehr hohen Extinktionswerte, die bei nur 1stündiger Enzymreaktion bei Blutflecken aus Placentablut auftreten. Dieses Phänomen ist damit zu erklären, daß die hitzestabile alkalische Phosphatase placentaren Ursprungs ist und an ihrem Bildungsort besonders hohe Aktivität aufweist.

Aus Tab. 14b ist ersichtlich, daß aus allen, auch den 19 Monate alten Blutflecken venösen Schwangerenblutes hitzestabile alkalische Phosphatase nachweisbar ist. Dieser Enzymnachweis ist sogar bei den Blutflecken 8/74 und 9/74 erfolgreich, die 18 Monate alt und nur 1 cm<sup>2</sup> groß sind.

Demgegenüber ist es auch in diesem Teilversuch nicht möglich, aus einem aus männlichem Blut hergestellten Flecken das Enzym nachzuweisen: keiner dieser Blutflecken überschreitet den als kritisch angesehenen Extinktionsbetrag von 0,100.

Dennoch überraschen die relativ hohen Extinktionswerte des Blutflecks "männl.69". Dieser Blutfleck wurde in die Versuchsanordnung aufgenommen, um einen eventuell möglichen Einfluß des Schimmels festzustellen. Es zeigt sich kein Unterschied der Extinktionswerte zwischen dem verschimmelten und dem nicht verschimmelten Teilfleck dieses männlichen Probanden, weder bei 1stündiger noch bei 24stündiger Inkubation. Es wird jedoch für möglich gehalten, daß die makroskopisch nach Augenschein vorgenommene Unterscheidung zwischen verschimmeltem und nicht verschimmeltem Teilfleck nicht stichhaltig ist, da durch Aufbewahrung des Gesamtfleckens in gefaltetem Zustand eine mit bloßem Auge eventuell nicht erkennbare Übertragung des Schimmels auf die nicht verschimmelte Seite stattgefunden haben könnte. Auch wenn die Versuchsergebnisse einen eindeutigen und klaren Nachweis eines Schimmelfeinflusses nicht zulassen, sollte von der Verwendung verschimmelter Blutflecken in der forensischen Praxis abgeraten werden.

Es sei darauf hingewiesen, daß auch bei Messung des "echten Leerwerts gegen den Chemikalienblindwert" bei dem Blutfleck "männl.69" unerwartet hohe Extinktionswerte sowohl bei 1stündiger als auch bei 24stündiger Inkubation auftreten, die in diesem konkreten Fall nicht sicher geklärt werden können. Allgemein fällt auf, daß auch bei Vernachlässigung dieser extrem hohen Werte in der Meßreihe "e.L./Ch.Bl." eine etwas höhere Streubreite auftritt als in vorausgehenden Versuchen. Schon früher (vgl. Kapitel D,3, S. 47 ) wurde eine nicht konsequente Proportionalität der Meßwerte "e.L./Ch.Bl." mit der Blutfleckengröße festgestellt. Es wurde vermutet, daß beim Eliminieren der Blutflecken wieder in Lösung gehende Serumbestandteile für diese Wertestreuung verantwortlich sein könnten. Diesbezüglich trat in diesem letzten Experiment ein Problem auf, das in allen vorausgehenden Versuchen zu vernachlässigen war: Beim Ansetzen der Blutfleckversuche wurde

auf besondere Maßnahmen bei dem Eluieren verzichtet; es wurde lediglich darauf geachtet, daß die Blutflecken von der Pufferlösung bedeckt und durchfeuchtet waren. Am Versuchsende stellte sich immer heraus, daß während der Eliminierung der hitzelabilen Phosphatase und während der Enzymreaktion die als Blutträger fungierenden weißen Leinenlappchen vollständig von Blutbestandteilen ausgewaschen waren. Bei diesem letzten Versuch mit den über 3 Monate alten Blutflecken wiesen die Lappchen jedoch auch am Versuchsende noch eine dunkle Färbung auf, die darauf zurückgeführt wird, daß bei diesen relativ alten Blutflecken die Lösung der Blutbestandteile verzögert und nicht vollständig ablief, was sich eventuell auch in der größeren Streubreite der Meßwerte "echter Leerwert gegen Chemikalienblindwert" niederschlägt. Obwohl kein unmittelbarer Einfluß auf die Versuchsergebnisse erkenntlich ist, sollte doch daran gedacht werden, das Eluieren der Blutflecken in einer mehrstündigen Wartezeit vor Verarbeitung der Probenansätze abzuwarten.

Unabhängig von diesen kritisch angemerkten Einzelheiten muß der Nachweis der hitzestabilen alkalischen Phosphatase auch aus 19 Monate alten mit venösem Schwangerenblut getränkten Blutflecken als gelingen bezeichnet werden.

Als mehr theoretische Fehlerquelle kommt das bisher nur in zwei Fällen beobachtete Regan-Enzym in Frage, das unabhängig von einer Schwangerschaft bei Patienten mit Bronchial- und Lungenkarzinom festgestellt wurde und das dieselben Eigenschaften wie die hitzestabile alkalische Phosphatase aufweist (FISHMAN).

#### 4. Kurze Beschreibung der optimalen Technik

- 1.) Vom Blutfleckenstoff (in dieser Arbeit Leinen) 3 mal 1 cm<sup>2</sup> ausschneiden. (Der Blutfleckenenträger muß von 0,5 ml Pufferlösung bedeckt werden.)
- 2.) 0,5 ml Carbonat-Puffer (siehe Kapitel B,5) zugeben.
- 3.) Eliminierung der hitzelabilen alkalischen Phosphatase

durch Inkubieren des Ansatzes bei 60°C für 40 min im Warmluftschrank.

- 4.) 0,5 ml Dinatrium-p-Nitrophenylphosphat-Lösung (0,443 g / 100 ml 0,001 N HCl) zugeben.
- 5.) 24 h bei 37°C im Warmluftschrank zur Enzymreaktion inkubieren.
- 6.) Unterbrechung der Enzymreaktion durch 1 ml 10%ige Trichloressigsäure.
- 7.) Filtrieren des Ansatzes durch Faltenfilter (SCHLEICHER und SCHÜLL, Artikel Nr. Selecta 595 1/2) im Trichter; 0,5 ml des Filtrats in anderes Röhrchen übertragen.
- 8.) Alkalisieren mit 2 ml 0,2 N NaOH.
- 9.) Extinktionsmessung im Eppendorf-Photometer bei 405 nm gegen "echten Leerwert" (siehe Kapitel B,3 und E).
- 10.) Bewertung: Bei Extinktionswerten über 0,100 liegt hitzestabile alkalische Phosphatase vor.

## G Zusammenfassung

Bei Gewaltdelikten an Schwangeren sowie bei verheimlichter Gravidität und Kindestötung kurz nach der Geburt kann die Frage auftreten, ob gefundene Blutspuren von einer Schwangeren verursacht wurden.

Ein Schwangerschaftsnachweis an getrockneten Blutflecken wurde 1973 von OYA, ASANO und FUWA beschrieben. Er beruht auf der Bestimmung der hitzestabilen alkalischen Phosphatase und gelang den Autoren bis zu einem Blutspurenalter von 1 Monat.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Eignung der genannten Methode zum Schwangerschaftsnachweis zunächst an hämolysefreiem, frischem Serum geprüft.

Nach Ermittlung eines geeigneten Leerwertes, der von OYA und Mitarbeitern nicht erwähnt worden war, konnte durch Verwendung eines bei DELORY und KING (1945) beschriebenen Carbonat-Bicarbonat-Puffers mit einem pH-Wert von 10,05 an Stelle des von OYA und Mitarbeitern angegebenen Glycin-Puffers eine Empfindlichkeitssteigerung des Enzymnachweises erzielt werden, die bei Versuchen mit hämolysefreiem Serum und getrockneten Blutflecken in gleicher Weise festzustellen war.

Da die japanischen Autoren auf schriftliche Anfrage eine geringe Beeinträchtigung der Ergebnisse ihrer Blutfleckenuntersuchung durch die hier zwangsläufig auftretende Hämolyse bestätigten, wurde in Parallelversuchen mit hämolysefreiem Serum und dem gleichen Serum mit künstlich erzeugter Hämolyse versucht, Art und Ausmaß des Hämolyseeinflusses festzustellen.

Es stellte sich heraus, daß bei den Blutfleckenuntersuchungen nach Zugabe der Trichloressigsäure durch Hämolyse bedingte Schwebestoffe auftreten, die sich auch durch anschließendes Zentrifugieren nicht vollständig sedimentieren lassen. Sie gehen bei dem anschließenden Alkalisieren des verunreinigten Überstandes wieder in Lösung und bewirken dann durch Erhöhung des Meßwertes eine Verfälschung der Ergebnisse.

Es war deshalb notwendig, die hämolysebedingten Schwebestoffe

teilchen zu eliminieren, was dadurch erreicht wurde, daß das Zentrifugieren durch Filtrieren ersetzt wurde.

Da eine exakte Dosierung der in den Versuchsansatz eingehenden Blutmenge zwar unter experimentellen Laborbedingungen möglich, in der Praxis aber nur unvollkommen zu verwirklichen ist, wurde auf quantitative Aussagen bezüglich des nachgewiesenen Enzyms von vornherein verzichtet, wobei sich eine Umrechnung in definierte Enzymeinheiten erübrigte. Statt dessen wurden die gefundenen Extinktionswerte direkt einer Beurteilung unterzogen, ob überhaupt in dem zu untersuchenden Blutflecken hitzestabile alkalische Phosphatase nachzuweisen ist oder nicht. Zum Vergleich wurde ein Blutfleck aus männlichem Probandenblut mituntersucht.

Ferner wurde die Enzymreaktion von 1 h auf 24 h ausgedehnt. Nichtlineare Verhältnisse zwischen Dauer der Enzymreaktion und Menge an freigesetztem Substrat-Spaltprodukt können dabei vernachlässigt werden, da es nur um die Alternativaussage geht, ob im Versuchsansatz überhaupt hitzestabile alkalische Phosphatase nachweisbar ist oder nicht. Es ist daher lediglich von Bedeutung, ob auch nach verlängerter Enzymreaktion noch eindeutig zwischen Blutflecken aus Schwangerenblut und solchen aus Nicht-Schwangerenblut unterschieden werden kann. Entsprechend der Bedeutung einer solchen Aussage in Gerichts-fällen wurde die Fehlerbreite nach strengem Maßstab festgelegt.

Die Unterscheidung von Schwangeren- und Nicht-Schwangerenblutflecken war bei 24 h andauernder Enzymreaktion sicherer möglich als nach einer Inkubationszeit von 1 h. Die Abwandlungen der Versuchstechnik ergaben eine solche Verbesserung der Methodik, daß sogar noch aus 3 cm<sup>2</sup> großen und 19 Monate alten, auf Leinenlappchen aufgebrachten Spuren von Schwangerenblut hitzestabile alkalische Phosphatase festgestellt werden konnte. Da dieses Enzym in Placentablut wesentlich höhere Aktivität aufweist als im Venenblut schwangerer Frauen, kann der Nachweis von Geburtsblut mit der ermittelten Technik noch länger und mit noch weniger Ausgangsmaterial geführt werden.

H Anhang: Tabellarische Darstellung der verwendeten  
Blutflecken und ihr Herstellungsdatum

| Blutfleck Nr.   | Herstellungsdatum | Blutart                               |
|-----------------|-------------------|---------------------------------------|
| 0/74            | 19.4.74           | bei Geburt entnomme-<br>nes Venenblut |
| 2/74            | 29.4.74           | "                                     |
| 3/74            | 2.5.74            | "                                     |
| 4/74            | 6.5.74            | "                                     |
| 5/74            | 8.5.74            | "                                     |
| 6/74            | 14.5.74           | "                                     |
| 7/74            | 14.5.74           | "                                     |
| 8/74            | 20.5.74           | "                                     |
| 9/74            | 30.5.74           | "                                     |
| 10/74           | 18.6.74           | "                                     |
| 11/74           | 3.7.74            | "                                     |
| 12/74           | 3.7.74            | "                                     |
| 2/75            | 8.8.75            | "                                     |
| 3/75            | 12.8.75           | "                                     |
| 4/75            | 13.8.75           | "                                     |
| 5/75            | 14.8.75           | "                                     |
| 6/75            | 14.8.75           | "                                     |
| 7/75            | 17.8.75           | "                                     |
| 8/75            | 17.8.75           | "                                     |
| 9/75            | 22.8.75           | "                                     |
| 10/75           | 22.8.75           | "                                     |
| 11/75           | 23.8.75           | "                                     |
| 12/75           | 23.8.75           | "                                     |
| 13/75           | 25.8.75           | "                                     |
| 14/75           | 25.8.75           | "                                     |
| männl.69 (M.F.) | 22.10.69          | Venenblut                             |
| männl.75 (W.K.) | 12.8.75           | "                                     |
| Placenta 1 (L.) | 30.3.74           | Placentablut                          |
| Placenta 2 (M.) | 30.3.74           | "                                     |
| Placenta 3 (-)  | 1.4.74            | "                                     |

K Literatur

- AOBA, H., HARIU, Y., YAMAGUCHI, R.: Serum heat-stable alkaline phosphatase in normal and abnormal pregnancy.  
Tohoku J. exp. Med., 91, 201, 1967
- BECK, E., CLARK, L.: Plasma alkaline phosphatase. II Normative data for pregnancy.  
Amer. J. Obstet. Gynec., 60, 731, 1950
- BESSEY, O., LOWRY, O., BROCK, M.: A method for the rapid determination of alkaline phosphatase with five cubic millimeters of serum.  
J. biol. Chem., 164, 321, 1946
- CAYLA, J., FABRE, F.: La phosphatase sérique pendant la gestation.  
C. R. Soc. Biol., 120, 748, 1935
- DELORY, G., KING, E.: A sodium carbonate - bicarbonate buffer for alkaline phosphatase.  
Biochem. J., 39, 245, 1945
- FISHMAN, W.: Perspectives on alkaline phosphatase isoenzymes.  
Am. J. Med., 56, 617, 1974
- HAAG, V.: Untersuchungen zum Nachweis von Abort- und Geburtsblut in Blutflecken mittels des immunologischen Schwangerschaftstests.  
Diss. Marburg 1968
- JEACOCK, M., MORRIS, N., PLESTER, J.: The activity of alkaline and acid phosphatase in the human placenta.  
J. Obstet. Gynec. Brit. Cwlth., 70, 267, 1963
- Mc.MASTER, Y., TENNANT, R., CLUBB, J., NEALE, F., POSEN, S.: The mechanism of the elevation of serum alkaline phosphatase in pregnancy.  
J. Obstet. Gynec. Brit. Cwlth., 71, 735, 1964
- MERANZE, T., MERANZE, D., ROTHMANN, M.: Blood phosphatase in pregnancy.  
Am. J. Obstet. Gynec., 33, 444, 1937

- MESSER, R.: Heat-stable alkaline phosphatase as an index of placental function.  
Am. J. Obstet. Gynec., 98, 459, 1967
- OEPEN, I., MÜLLER, F.: Zum Polymorphismus der alkalischen Phosphatase.  
Z. Rechtsmedizin (im Druck)
- OYA, M., ASANO, M., FUWA, I.: Quantitative estimation of heat-stable alkaline phosphatase activity in dried blood stains and its application to the forensic diagnosis of pregnancy.  
Z. Rechtsmedizin, 73, 7, 1973
- POSEN, S., CORNISH, C., HORNE, M., SAINI, P.: Placental alkaline phosphatase and pregnancy.  
Ann. N.Y. Acad. Sci., 166, 733, 1969
- SCHLEYER, F.: Leitfaden der gerichtlich-medizinischen Blutspurenuntersuchung.  
Schmidt-Römhild, Lübeck, 1966
- SPEERT, H., GRAFF, S., GRAFF, A.: Serum phosphatase relations in mother and fetus.  
Am. J. Obstet. Gynec., 59, 148, 1950
- VERMEHREN, E.: Plasmaphosphatase während der Gravidität und der Laktation.  
Acta med. Scand., 100, 254, 1939
- YOUNG, J.: Origins of serum alkaline phosphatase.  
J. clin. Path., 20, 647, 1967

## Lebenslauf

Am 30. Januar 1943 wurde ich als Sohn des Diplom-Kaufmanns Erich Köhler und seiner Ehefrau Ursula Köhler, geb. Viehweger, in Kassel geboren.

Nach meiner Grundschulausbildung in Lohfelden von 1949-1954 besuchte ich von 1954-1956 das Realgymnasium Wesertor in Kassel. 1956 setzte ich meine schulische Ausbildung an der Wilhelmschule in Kassel fort, an der ich im neusprachlichen Zweig 1963 das Abitur ablegte.

Nach meiner Schulzeit leistete ich von 1963 bis 1965 einen zweijährigen Wehrdienst bei der Bundeswehr ab. Ab 1965 studierte ich an der naturwissenschaftlichen Fakultät der Philipps-Universität Marburg Psychologie und beendete das Studium nach 6 Semestern im April 1968 mit dem Vordiplom. Im Mai 1968 nahm ich an der medizinischen Fakultät derselben Universität das Studium der Zahnheilkunde auf, das ich am 7. Dezember 1973 mit dem Staatsexamen abschloß. Seit Mai 1974 bin ich in der Marburger Zahn-, Mund- und Kieferklinik als Zahnarzt tätig.

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren  
Professoren und Dozenten:

Amon, Bernhardt, Castenholz, Dehnicke, Dimroth, Engelhardt,  
Goebell, Haan, Hennis, Hering, Heuser, Hort, Ihm, Janke,  
Karlson, Keil, Koecke, Korb, Kühnel, Niemeyer, Petry,  
Pfütz, Riecken, Rohen, Rosemann, Rupec, Schienbein, Schiff,  
Schmidt H., Schmitz-Moormann, Schnell, Seidel, Walcher.

Bei Frau Prof. Dr. Oepen bedanke ich mich für die Überlassung des Themas und ihre Beratung bei Aufbau und Ausarbeitung der Dissertation. Ihre verständnisvolle Hilfe und fürsorgliche Betreuung bei der Ausräumung auftretender Schwierigkeiten erwähne ich in stets dankbarer Erinnerung.

Den Hebammen und Schwestern der Universitäts-Frauenklinik Marburg danke ich für die Hilfe bei der Beschaffung der Blutproben.









